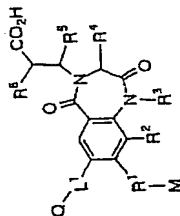


【特許請求の範囲】

【請求項1】 金属イオンキレート化剤に共有結合された酢タンバク質11b/111aレセプター結合性ベンゾジアゼピン誘導体を含んで成り、血小板凝集阻害についての標準アッセイにおいて測定したとき、ヒト血小板凝集を阻害する実質的な効力を保持する、化合物。

【請求項2】 下記式を有する請求項1に記載の化合物：

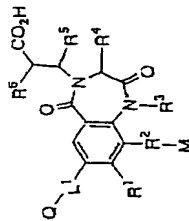
【化1】



式中R¹はC₁-C₈低級アルキルであり、R²、R³、R⁴、R⁵、およびR⁶は各々独立してH、C₁-C₈低級アルキル、置換アルキル、アリール、置換アリール、またはそれらの組合わせであり、L¹は結合部分であり、Qは正に帯電した窒素含有部分であり、そしてMは金属イオンキレート化剤である。

【請求項3】 下記式を有する請求項1に記載の化合物：

【化2】



式中R²はC₁-C₈低級アルキルであり、R³、R⁴、R⁵、R⁶、およびR⁶は各々独立してH、C₁-C₈低級アルキル、置換アルキル、アリール、置換アリール、またはそれらの組合わせであり、L¹は結合部分であり、Qは正に帯電した窒素含有部分であり、そしてMは金属イオンキレート化剤である。

【請求項4】 下記式を有する請求項1に記載の化合物：

【化3】

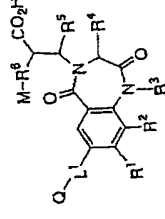
(19) 日本国特許庁 (J P)		(12) 公表特許公報 (A)		(11) 特許出願公報番号	
				特表2003-503310	
				(P2003-503310A)	
				(43) 公表日 平成15年1月28日(2003.1.28)	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	
				F I	
				C 07 K 5/00	
				A 61 P 7/02	
				C 07 K 5/023	

(4)

アリール、またはそれらの組合わせであり、 L^1 は結合部分であり、Qは正に帯電した窒素含有部分であり、そしてMは金属イオンキレート化剤である。

【請求項7】 下記式を有する請求項1に記載の化合物：

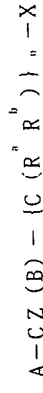
【化6】



式中 R^6 は C_1-C_8 低級アルキルであり、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、および R^5 は各々独立してH、 C_1-C_8 低級アルキル、置換アルキル、アリール、置換アリール、またはそれらの組合わせであり、 L^1 は結合部分であり、Qは正に帯電した窒素含有部分であり、そしてMは金属イオンキレート化剤である。

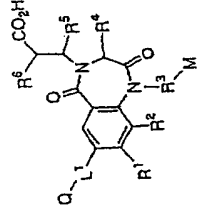
【請求項8】 キレート化剤が単一のチオール含有基を含んでなる、請求項1に記載の化合物。

【請求項9】 単一のチオール含有基が下記式を有する、請求項8に記載の化合物：



式中AはH、 $HOOC-$ 、 H_2NOC- 、 $-NHOC-$ 、 $-OOC-$ 、 R^a 、 $NOC-$ または R^a であり、BはH、SH、 $-NHR^a$ 、 $-N(R^a)-$ または R^a であり、ZはHまたは R^a であり、XはSH、 $-NHR^a$ 、 $-N(R^a)$ または R^a であり、 R^a 、 R^b 、 R^c および R^d は独立してH、直鎖状 C_1-C_8 アルキル、分枝鎖状 C_1-C_8 アルキル、または環状 C_3-C_8 アルキルであり、nは0、1または2であり、 R^a は C_1-C_8 アルキル、アミノ酸、または2〜約10アミノ酸を含んで成るペプチドであり、そして(1) Bが $-NHR^a$ または $-N(R^a)-$ である場合、XはSHでありかつnは1または2であり、(2) Xが $-NHR^a$ または $-N(R^a)-$ である場合、BはSHでありかつnは1または2であり、(3) BがHまたは R^a である場合、Aは $HOOC-$ 、 H_2NOC- 、 $-NHOC-$ または $-OOC-$ であり、XはSHでありかつnは0または

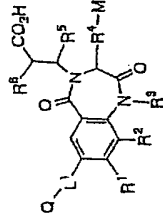
(3)



式中 R^3 は C_1-C_8 低級アルキルであり、 R^1 、 R^2 、 R^4 、 R^5 、および R^6 は各々独立してH、 C_1-C_8 低級アルキル、置換アルキル、アリール、置換アリール、またはそれらの組合わせであり、 L^1 は結合部分であり、Qは正に帯電した窒素含有部分であり、そしてMは金属イオンキレート化剤である。

【請求項5】 下記式を有する請求項1に記載の化合物：

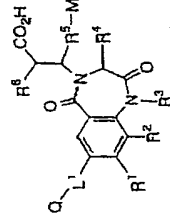
【化4】



式中 R^4 は C_1-C_8 低級アルキルであり、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^5 、および R^6 は各々独立してH、 C_1-C_8 低級アルキル、置換アルキル、アリール、置換アリール、またはそれらの組合わせであり、 L^1 は結合部分であり、Qは正に帯電した窒素含有部分であり、そしてMは金属イオンキレート化剤である。

【請求項6】 下記式を有する請求項1に記載の化合物：

【化5】

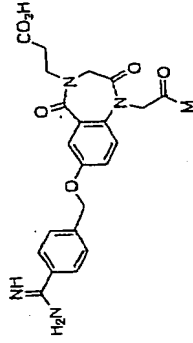


式中 R^5 は C_1-C_8 低級アルキルであり、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、および R^6 は各々独立してH、 C_1-C_8 低級アルキル、置換アルキル、アリール、置換

は1であり、(4) AがHまたはR¹である場合、BがSHであるとき、Xは-NHR¹または-N(R¹)₂でありかつXがSHであるとき、Bは-NHR¹または-N(R¹)₂でありかつnは1または2であり、(5) XがHまたはR¹である場合、AはHOOC-、H₂NOC-、-NHOC-または-OOC-でありかつBはSHであり、(6) Zがメチルである場合、Xはメチルであり、AはHOOC-、H₂NOC-、-NHOC-または-OOC-でありかつBはSHでありかつnは0であり、そして(7) BがSHである場合、XはSHではなくそしてXがSHであるとき、BはSHではない。

【請求項10】 下記式の化合物：

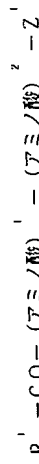
【化7】



式中Mは金属イオンキレート化剤である。

【請求項11】 Mが下記の基から成る群から選択される、請求項10に記載の化合物：

a)



式中(アミノ酸)¹および(アミノ酸)²は各々独立してチオール基を含まない任意の第一級α-またはβ-アミノ酸であり、Z¹はシステイン、ホモシステイン、イソシステイン、ペニシルアミン、2-メルカプトエチルアミン、2-メルカプトプロピルアミン、2-メルカプト-2-メルカプロピルアミン、および3-メルカプトプロピルアミンから成る群から選択され、そしてR¹は低級(C¹-C⁴)アルキルであるか、あるいはR¹-COはアミノ酸、ペプチド、または(a a) -ペプチドであり、ここでZ¹はシステイン、ホモシステイン、イソシステインまたはペニシルアミンであるとき、Z¹はヒドロキシル基、NR³R⁴基(ここでR³およびR⁴の各々は独立してH、結合、低級(C¹-C⁴)アル

キルである)、アミノ酸または2~10アミノ酸を含んで成るペプチドに共有結合されたカルボニル基である：

b)



式中(アミノ酸)¹および(アミノ酸)²は各々独立してチオール基を含まない任意の第一級α-またはβ-アミノ酸であり、Yはシステイン、ホモシステイン、イソシステイン、ペニシルアミン、2-メルカプトアセテート、2-メルカプトプロピオネート、2-メルカプト-2-メルカプロピオネート、および3-メルカプトプロピオネートから成る群から選択され、そしてR²はH、結合、低級(C¹-C⁴)アルキルであり、そしてNHR²はアミノ酸、ペプチド、または(a a) -ペプチドであり、ここでYはシステイン、ホモシステイン、イソシステインまたはペニシルアミンであるとき、Yは-H、アミノ酸、ペプチド、または(a a) -ペプチドに共有結合されたアミノ基を含んで成る。

【請求項12】 Mが-Gly-Gly-Cys、-Gly-Gly-Cysアミド、Gly-Gly-Cys、Cys-Gly-Gly、-Gly-Gly-Gly-Cys(配列番号1)、-Gly-Gly-Gly-Cysアミド(配列番号1)、Arg-Gly-Cys、-(ε-Lys)-Gly-Cys、-(δ-Orn)-Gly-Cys、-(γ-Dab)-Gly-Cys、および-(β-Dab)-Lys-Cysから成る群から選択される、請求項10に記載の化合物。

【請求項13】 Mが-Gly-Gly-Gly-Cysアミド(配列番号1)である、請求項10に記載の化合物。

【請求項14】 1-[(カルボキシグリシル-グリシル-グリシル-スチンアミド)メチル]-4-(2-カルボキシエチル)-7-[(4-アミノフェニル)メチル]-3,4-ジヒドロ-1H-1,4-ベンゾジアゼピン-2,5-ジオントリフルオロアセテート

を含んで成る医薬組成物。

【請求項15】

Tcを更に含んで成る、請求項14に記載の医薬

組成物。

【請求項24】 有効診断量の請求項20に記載のキレートを含む哺乳動物の体に投与し、そして血栓に局在化した放射能を検出する工程を含んでなる、哺乳動物の体における血栓を検出する方法。

【請求項25】 a) 前もって決定した量の1-[(カルボキシグリシル-グリシル-グリシル-システインアミド)メチル]-4-(2-カルボキシエチル)-7-[(4-アミノジノフェニル)メチル]-3,4-ジヒドロ-1H-1,4-ベンゾジアゼピン-2,5-ジオントリフルオロアセテート；および

b) 還元剤；

を含有する密閉されたバイアルを含んで成るキット。

【請求項16】 γ 放射放射性核種と化合物とを含んでなり、前記化合物は金属イオンキレート成分に共有結合された糖タンパク質I1b/I11a/レセプター結合性ベンゾジアゼピンを含んでなり、ここで前記化合物は血小板凝集アッセイの標準阻害において測定したとき、ヒト血小板凝集を阻害する実質的な効力を保持する、シンチグラフィック造影剤。

【請求項17】 放射性核種が^{99m}Tcである、請求項16に記載のシンチグラフィック造影剤。

【請求項18】 γ 放射放射性核種と化合物とを含んでなり、前記化合物は金属イオンキレート成分に共有結合された糖タンパク質I1b/I11a/レセプター結合性ベンゾジアゼピンを含んで成り、ここで前記化合物は血小板凝集アッセイの標準阻害において測定したとき、ヒト血小板凝集を阻害する実質的な効力を保持する、錯体。

【請求項19】 放射性核種が^{99m}Tcである、請求項18に記載の錯体。

【請求項20】 金属イオンキレート成分に共有結合された糖タンパク質I1b/I11a/レセプター結合性ベンゾジアゼピンを含んで成る化合物の^{99m}Tcキレート；ここで

a) 血小板凝集アッセイの標準阻害において測定したとき、前記化合物はヒト血小板凝集を阻害する実質的な効力を保持する；そして

b) 前記キレートは^{99m}Tcに結合した少なくとも1つの硫酸を含有する。

【請求項21】 有効診断量の請求項15に記載の組成物を哺乳動物の体に投与し、そして血栓に局在化した放射能を検出する工程を含んでなる、哺乳動物の体における血栓を検出する方法。

【請求項22】 有効診断量の請求項17に記載の造影剤を哺乳動物の体に投与し、そして血栓に局在化した放射能を検出する工程を含んでなる、哺乳動物の体における血栓を検出する方法。

【請求項23】 有効診断量の請求項19に記載の錯体を哺乳動物の体に投与し、そして血栓に局在化した放射能を検出する工程を含んでなる、哺乳動物の体における血栓を検出する方法。

【発明の詳細な説明】

本発明は、血栓の形態的造影分野に関する。さらに詳しくは、本発明は血栓を造影する正に特選したに関する。

発明の背景

血栓は心臓血管内に形成する血液凝固物である。血栓の形成、すなわち、血栓症は、血管、例えば、動脈、静脈、または毛細血管の局所的閉塞を引き起こすことがある。静脈の血栓は、通常、より下方位において形成し、そして血管壁の炎症または静脈の閉塞を引き起こすことによって急性症候を生成することがある。静脈血栓片は、また、心臓血管系を通して循環して、遠い部位、例えば、肺において栓、または塞栓を形成することがある。動脈血栓は普通に脈管性疾患、例えば、アテローム性動脈硬化症に関連づけられ、そして血流を閉塞するか、あるいは毛細血管を塞栓することによって組織的虚血（局所的貧血）を生成することがある。また、血栓は心臓において、例えば、炎症または損傷した弁上に、心筋梗塞に隣接する組織上に、損傷した房内に、または人工弁上に形成することがある。

すべての血栓はタンパク質フィブリンおよび血球を含有するが、存在する特定の血球およびフィブリン/血球の比率は、例えば、血栓形成部位における血流および血栓の年齢のために、異なることがある。高速血流部位に形成する動脈血栓は、細いフィブリン鎖により一緒に結合した血小板凝集物を含有する。静脈血栓はほとんどいて血流領域において形成し、散在するフィブリンおよびより少ない血小板を含む赤血球を含有する。遅い〜中程度の流れの条件下に形成する血栓は、赤血球、血小板、およびフィブリンの混合物を含有する。白血球、すなわち、白色血球は、それらが老化するとき、血栓に移動し、血栓の中に絡み込まれるようになる。さらに、老化する血栓中の凝集した血小板は溶解し、フィブリンと置換される。

治療を選択し、最適化し、そしてモニターするために、種々の種類の血栓の正確な検出を必要とする。治療は血栓の位置および特質により異なることがある。最近、ACUTECTTM、すなわち、^{99m}Tc放射能標識化ペプチド、アプシチド (apcitiide) を作るキットは、米国において、急性深部静脈血栓症

(DVT) を造影する放射性薬学的製品として販売が承認された。ACUTECTTM の商業的に入手可能性は、急性DVTの検出の精度を有意に改良し、結局、

このような血栓の治療を改善する。しかしながら、他の種類の血栓の検出のために放射性薬学的製品は承認されてきていて、そして他の静脈血栓、例えば、肺の血栓および動脈血栓の検出に利用可能な大部分正確な方法は侵入性である。種々の種類の血栓を検出することができると追加分の非侵入性因子が必要とされている。

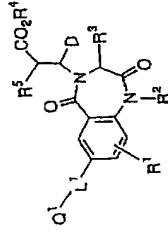
^{99m}Tc放射能標識化アプシチドは、血小板の表面上の最も豊富な糖タンパク質であるGPIIb/IIIaレセプターに結合する。GPIIb/IIIaレセプターは血小板凝集物に要求され、そして血栓形成の決定的な成分であり、接着タンパク質フィブリノゲン（フィブリンの前駆体）、フィブロンectin、フォン・ウィルブラント因子、およびグロトネクチンのためにレセプターとして機能する。GPIIb/IIIaとその天然リガンドとの間の相互作用は、トリペプチドアルギニン-グリシン-アスパラギン酸 (RGD) により促進される。アプシチドは、GPIIb/IIIaと相互作用すると考えられるトリペプチド、すなわち、L-[S-(3-アミノプロピル) システイン]- グリシン-アスパラギン酸を含有する。

米国特許第5,645,815号には、高い品質の血栓造影剤が約0.3μMより低いIC₅₀で血小板凝集を阻害することができる、GPIIb/IIIaレセプター結合性化合物を含んでなることが開示されている。米国特許第5,830,856号には、このような造影剤が約0.1μMより低いIC₅₀で血小板凝集を阻害することができる、GPIIb/IIIaレセプター結合性化合物を含んでなることが開示されている。

米国特許第5,403,836号、第5,493,020号、第5,565,449号、第5,663,166号、第5,674,863号、第5,674,865号、第5,705,890号、および第5,716,951号に開示されている、GPIIb/IIIa結合性血小板凝集インヒビターの1つのクラスは、置換ベンゾジアゼピンジオリオンである。ベンゾジアゼピンジオリオンカホールドは、血小板凝集阻害活性と相関する、RGDトリペプチドの「カップド (cuppe

d) J 立体配置に近似する。米国特許第5, 403, 836号、第5, 493, 020号、第5, 565, 449号、第5, 663, 166号、第5, 674, 863号、第5, 674, 865号、第5, 705, 890号、および第5, 716, 951号には、下記一般式の誘導体を包含する、ベンゾジアゼピン誘導体のいくつかの大きいクラスが記載されている：

【化8】



式中R¹、R²、およびR³は各々独立してHまたは反応性基であり、R⁴およびR⁵は各々独立してH、アルキル、置換アルキル、アリール、置換アリール、またはそれらの組合わせであり、Dは水素、フェニル、または低級アルキルであり、L¹は結合部分であり、そしてQ¹は正に帯電した窒素含有部分である。米国特許第5, 403, 836号、第5, 493, 020号、第5, 565, 449号、第5, 663, 166号、第5, 674, 863号、第5, 674, 865号、第5, 705, 890号、および第5, 716, 951号の置換ベンゾジアゼピン誘導体はもっぱら治療剤として記載されている。

Ku他(1993) J. Am. Chem. Soc. 115, 8861-8862は、細タンパク質11b/111aレセプター仲間血小板凝集のインヒビターとして、ベンゾジアゼピン誘導の設計および合成を記載している。Ku他の1, 4-ベンゾジアゼピン誘導は、もっぱら潜在的抗血栓栓剤として記載されている。米国特許第4, 656, 026号には、脳組織の磁気共鳴造影のためのスピニ標識化ベンゾジアゼピンが記載されている。米国特許第4, 477, 169号には、体液中のベンゾジアゼピンレベルを測定するためにラジオイムノアッセイにおいて使用される放射能ヨウ素化ベンゾジアゼピンが開示されている。J. S. P. No. 4, 885, 152号には、脳組織中のベンゾジアゼピンレセプターを検出するための放射能ヨウ素化および放射能臭素化ベンゾジアゼピン誘導体が

記載されている。米国特許第4, 997, 771号には、ベンゾジアゼピン誘導体レセプター結合活性をアッセイするために使用される³H-ベンゾジアゼピンが開示されている。米国特許第5, 096, 695号には、臓造影剤として使用するための放射能ヨウ素化ベンゾジアゼピン誘導体が開示されている。WO 95/12610号には、鉛体化性レニウムまたはテクネチウムイオンにおいて使用するための、ベンゾジアゼピンを包含する、種々のリガンドに共有結合することのできるN-アルキルペプチドキレート化剤が開示されている。JP 5-310711号には、てんかん、パーキンソン症候群および脳浮腫を診断する脳神経中のベンゾジアゼピンレセプターの電子スピン共鳴造影のためのN-置換ベンゾジアゼピン-2-オン誘導体が開示されている。

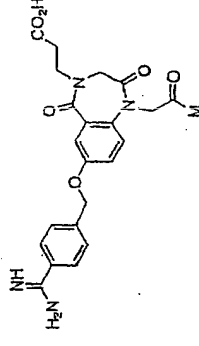
発明の要約

本発明者らは、ベンゾジアゼピン誘導体を有効な血栓造影剤として使用できることを発見した。

1つの態様において、本発明は、金属イオンキレート化剤に共有結合されたタンパク質11b/111aレセプター結合性ベンゾジアゼピン誘導体を含んで成り、血小板凝集阻害についての標準アッセイにおいて測定したとき、ヒト血小板凝集を阻害する実質的な効力を保持する化合物を提供する。

他の態様において、下記式を有する化合物を提供する：

【化9】



式中Mは金属イオンキレート化剤である。

他の態様において、本発明は、γ放射放射性核種と、本発明の化合物とを含有するシンチンググラフィック造影剤を提供する。

他の態様において、本発明は、γ放射放射性核種と、本発明の化合物とを含有する

で成る錯体を提供する。

なお他の態様において、本発明は、化合物^{99a}、Tcに対してキレート化したとき、血小板凝集阻害についての標準アッセイにおいて測定して、ヒト血小板凝集を阻害する実質的効力を保持し、かつキレート化剤が^{99m}Tcに結合した少なくとも1つの硫酸を含有する、金属イオンキレート化成分に共有結合された新タンパク質I1b/I11aレセプター結合性ベンゾジアゼピンを含んで成る化合物の^{99m}Tcキレート化剤を提供する。

他の態様において、本発明は、有効診断標の本発明のシンチグラフィック造影剤または錯体を哺乳動物の体に投与し、そして血栓に局在化された放射能を検出する工程を含む方法を提供する。

発明の詳細な説明

本明細書において参照する特許および科学文献は、当業者にとって入手可能な知識を確立する。

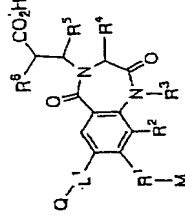
本発明の化合物は、新タンパク質I1b/I11aレセプター結合性ベンゾアゼピン成分と、金属イオンキレート化成分と含んで成る。本発明によれば、用語「ベンゾジアゼピン誘導体」または「ベンゾジアゼピン成分」は互換的であり、そしてベンゾジアゼピン核、すなわち、芳香族6メンバール環に融合された7メンバール環を含んで成る任意の分子を包含するとして定義される。血小板凝集阻害の標準アッセイ、例えば、Zucker, Methods in Enzymology (1989) 169:117-133に記載されているアッセイにおいてヒト血小板凝集について阻害濃度50% (IC₅₀) の化合物により測定したとき、化合物が実質的な効力を保持するかぎり、本発明の化合物は任意のベンゾジアゼピン成分を含んで成ることができる。本発明において定義するとき、「実質的な効力」は、好ましくは、約1 μMより低いヒト血小板凝集の阻害についてのIC₅₀、より好ましくは約0.3 μMより低いヒト血小板凝集の阻害についてのIC₅₀、最も好ましくは約0.1 μMより低いヒト血小板凝集の阻害についてのIC₅₀として定義される。

好ましくは、ベンゾジアゼピンの血小板凝集阻害性に実質的に影響を与えないで金属イオンキレート化剤の共有結合のために、置換ベンゾジアゼピンをさら

に誘導化することができるかぎり、Ku他、前掲に開示されている置換1,4-ベンゾジアゼピン誘導体は本発明の化合物のベンゾジアゼピン成分として使用される。同様に、ベンゾジアゼピンの血小板凝集阻害活性に実質的に影響を与えないで金属イオンキレート化剤の共有結合のために、置換ベンゾジアゼピン誘導体をさらに誘導化することができるかぎり、米国特許第5,403,836号、第5,493,020号、第5,565,449号、第5,663,166号、第5,674,863号、第5,674,865号、第5,705,890号、および第5,716,951に開示されている任意の置換ベンゾジアゼピン誘導体は本発明の化合物のベンゾジアゼピン成分として使用される。より好ましくは、米国特許第5,663,166号に開示されかつ特許請求されている置換1,4-ベンゾジアゼピン-2,5-ジオンは、本発明の化合物中の新タンパク質I1b/I11a結合性成分として使用される。最も好ましくは、後に記載する式に対応する置換1,4-ベンゾジアゼピン-2,5-ジオンは、本発明の化合物中の新タンパク質I1b/I11a結合性成分として使用される。

1つの態様において、本発明は、下記式を有する化合物を提供する：

【化10】

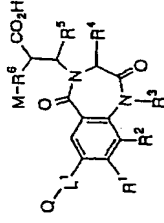


式中R¹はC₁-C₈低級アルキルであり、R²、R³、R⁴、R⁵、およびR⁶は各々独立してH、C₁-C₈低級アルキル、置換C₁-C₈アルキル、アリール、置換アリール、またはそれらの組合わせであり、L¹は結合部分であり、Qは正に帯電した陰素含有部分であり、そしてMは金属イオンキレート化剤である。

本発明において定義するとき、「置換C₁-C₈アルキル」は、ヒドロキシル基、エーテル、チオエーテル、C₁-C₈分枝鎖状炭化水素、C₁-C₈直鎖状炭化水素、アミン、第一級アルキルアミン、第二級アルキルアミン、第三級アリ

他の態様において、本発明は、下記式を有する化合物を提供する：

【化15】



式中R¹はC₁-C₈低級アルキルであり、R²、R³、R⁴、およびR⁵は各々独立してH、C₁-C₈低級アルキル、置換C₁-C₈アルキル、アリール、置換アリール、またはそれらの組合わせであり、L¹は結合部分であり、Qは正に帯電した窒素含有部分であり、そしてMは金属イオンキレート化剤である。

上記式の各々において、結合部分L¹は約3～約9つのメチレン基を含有する2個の基であるか、あるいはL¹は約3～約9つのメチレン基に等しい長さを含む2個の基である。好ましくは、L¹は約4～約6つのメチレン基に等しい長さを有する。より好ましくは、L¹は約5つのメチレン基に等しい長さを有する。L¹は好ましくは1またはそれ以上のs p²またはs p原子を含有し、こうして拘束される。本発明によれば、L¹は1またはそれ以上のアルケン、アルキン、アリール、複素環式、またはN、OまたはSを含有する1またはそれ以上の官能基を含有することができる。好ましくは、L¹はケトン、スルホキシド、第二級アミン、アミド、ウレイド、カルバメート、スルホンアミド、またはスルホンを含んで成る。より好ましくは、L¹はチオエーテルを含んで成る。より好ましくは、L¹はエーテル、特にアルキルエーテル、例えば、メチルエーテルを含んで成る。

正に帯電した部分Qは1またはそれ以上の窒素原子を含有し、そして前記原子が生理学的pHにおいて少なくとも10%正に帯電しているために十分なpK_bを有する。本発明によれば、Qは単離されているか、あるいは他の窒素原子と接合している1またはそれ以上の第一級、第二級、第三級、または第四級アミノまたはイミンを含んで成ることができる。あるいは、Qは飽和もしくは不飽和の(

芳香族を包含する) 複素環式基であることができ、ただし前記基は生理学的pHにおいて正電荷を有する。

本発明によれば、Qは下記のような基から選択されるが、これらに限定されない：アミノ、イミノ、アミジノ、アミノメチレンイミノ、アミノメチレンアミノ、イミノメチルアミノ、グアジニノ、N'-アミノグアジニノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアミノ、アルキリデンアミノ、ピラニル、ピロリル、イミダゾリル、ピラゾリル、ピリジル、ピラジニル、ピリミジニル、ピリダジニル、インドリジニル、イソインドリル、3H-インドリル、インドリル、1H-インドゾリル、プリニル、4H-キノリジニル、イソキノリル、キノリル、フタラジニル、ナフチリジニル、キノキサリニル、キナゾリニル、シンノリニル、プテリジニル、4aH-カルバゾリル、カルバゾリル、b-カルボリニル、フェナントリジニル、アクリジニル、フェナントロニル、フェナジニル、フェナルサジニル、フェノチアジニル、ピロリニル、イミダゾリジニル、イミダゾリニル、ピラゾリジニル、ピラゾリニル、ピペリジニル、ペペラジニル、インドリニル、イソインドリニル、キヌクリジニル、モルホリニル、1,3-ジアザシクロヘキシー4-エン、およびそれらの組合わせ。必要に応じて、任意の前述の窒素含有複素環は、アミノ、イミノ、アミジノ、アミノメチレンアミノ、イミノメチルアミノ、グアジニノ、N'-アミノグアジニノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアミノ、またはアルキリデンアミノ基で置換されることができる。好ましくは、Qはアミジノまたは置換アミジノ基である。

置換糖タンパク質I1b/I11aレセプター結合性ベンゾジアゼピンジオンを製造する方法は、米国特許第5,403,836号、第5,493,020号、第5,565,449号、第5,663,166号、第5,674,863号、第5,674,865号、第5,705,890号、および第5,716,951および下記の実施例に開示されている。置換糖タンパク質I1b/I11aレセプター結合性ベンゾジアゼピンを製造する方法は、K_u他、前掲に開示されている。

本発明の化合物は、任意の金属イオンキレート化剤を含んで成ることができる。金属イオンキレート化剤の存在が糖タンパク質I1b/I11aレセプターに

はC₀-ベンゾジアゼピンである。本発明によれば、ビスアミド、ビスチオール
の式中の置換誘導体は上に定義した通りである。

あるいは、本発明の化合物は、下記のものから成る群から選択される式を有す
る金属イオンキレート化剤を含んで成ることができる：

ジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA)；

下記式を有するDTPAの誘導体：



) $(\text{CR}_2) \text{N} (\text{CH}_2 \text{COOH})_2$ ；

式中各Rは独立してH、C₁-C₄アルキル、またはアリールであり、そして
1つのRは2個のリンカーに共有結合している；

エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)；

下記式を有するEDTAの誘導体：

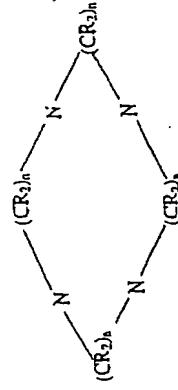


式中各Rは独立してH、C₁-C₄アルキル、またはアリールであり、そして
1つのRは2個のリンカーに共有結合している；

1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン四酢酸およびその誘導体；

下記式を有する金属イオンキレート化剤：

【化20】



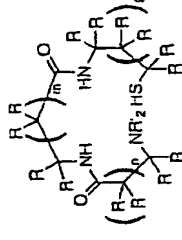
式中nは2または3である整数であり、そして各Rは独立してH、C₁-C₄
アルキル、またはアリールであり、そして1つのRは2個のベンゾジアゼピン誘
導体に共有結合している。

より好ましくは、本発明の化合物はモノアミン、ジアミド、単一のチオールを
含む金属イオンキレート化剤、例えば、普通に置換された同時連続USSN

08/253, 973号に記載されているキレート化剤を含んで成る。このよ

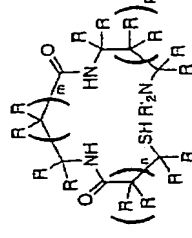
うな金属イオンキレート化剤の例は下記式を有するキレート化剤である：

【化21】



および

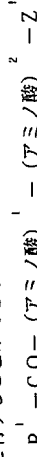
【化22】



式中n、mおよびpの各々は独立して0または1である整数であり、各R'は
独立してH、低級アルキル、C₂-C₄ヒドロキシアルキル、またはC₂-C₄
アルコキシアルキルであり、そして各Rは独立してHまたはR''であり、ここで
R''はチオール基を含有しない置換C₁-C₄アルキル、非置換C₁-C₄アル
キル、非置換フェニル、またはチオール基を含有しないフェニルであり、そして
1つのRまたはR'はL^zであり、L^zは金属キレート化剤を配タンパク質11
b/111aレセプター結合性ベンゾジアゼピンに結合させる2個のリンカー部
分であり、ここで1つのR'はL^zであり、NR^zはアミンである。この態様
において、L^zはC₁-C₄直鎖状アルキル基、分枝鎖状アルキル基、環状アル
キル基、カルボン酸エステル、カルボキシアミド、スルホンアミド、エーテル、
チオエーテル、アミン、アルケン、アルキン、1, 2-結合、置換されていても
よい、ベンゼン環、1, 3-結合、置換されていてもよい、ベンゼン環、1, 4
-結合、置換されていてもよい、ベンゼン環、またはアミノ酸、またはそれらの
組合わせであることができる。この態様において、R''はC₁-C₄直鎖状アル
キル；分枝鎖状アルキル基；環状アルキル基；-C₄OC₁-、-C₄NHC₁-

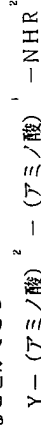
り、AはHOOC-、H₂NOC-、-NHOC-または-OOC-でありかつBはSHでありかつnは0であり、そして(7) BがSHである場合、XはSHではなくそしてXがSHであるとき、BはSHではない。

本発明によれば、単一のチオールを含有する基を含んで成る金属イオンキレート化剤は下記式を有することができる：



式中 (アミノ酸)¹ および (アミノ酸)² は各々独立してチオール基を含まない任意の第一級α-またはβ-アミノ酸であり、Z¹ はシステイン、ホモシステイン、イソシステイン、ペニシルアミン、2-メルカプトエチルアミン、2-メルカプトプロピルアミン、2-メルカプト-2-メチルプロピルアミン、および3-メルカプトプロピルアミンから成る群から選択され、そしてR¹ は低級(C¹-C⁴) アルキルであるか、あるいはR¹-COはアミノ酸、ペプチド、または(a a)-ペプチドであり、ここでZ¹ はシステイン、ホモシステイン、イソシステインまたはペニシルアミンであるとき、Z¹ はヒドロキシル基、NR³ R⁴ 基(ここでR³ およびR⁴ の各々は独立してH、結合、低級(C¹-C⁴) アルキルである)、アミノ酸または2-10アミノ酸を含んで成るペプチドに共有結合したカルボニル基である；および

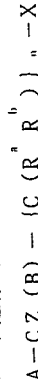
あるいは、単一のチオールを含有する基を含んで成る金属イオンキレート化剤は下記式を有することができる：



式中 (アミノ酸)¹ および (アミノ酸)² は各々独立してチオール基を含まない任意の第一級α-またはβ-アミノ酸であり、Yはシステイン、ホモシステイン、イソシステイン、ペニシルアミン、2-メルカプトアセテート、2-メルカプトプロピオネート、2-メルカプト-2-メチルプロピオネート、および3-メルカプトプロピオネートから成る群から選択され、そしてR² はH、結合、低級(C¹-C⁴) アルキルであり、そしてNHR² はアミノ酸、ペプチド、または(a a)-ペプチドであり、ここでYはシステイン、ホモシステイン、イソシステインまたはペニシルアミンであるとき、Yは-H、アミノ酸、ペプチド、または(a a)-ペプチドに共有結合されたアミノ基を含んで成る。

一または-C_q、S_c、一基、ここでqおよびrは各々独立して1~5の整数であり、ここでq+rの合計は6以下である；(C₁-C₆) アルキル-X、ここでXはヒドロキシル基、置換アミン、グアニジン、アミジン、置換チオール基、またはカルボン酸、エステル、ホスフェート、またはサルフェート基である；フェニル基またはハロゲン、ヒドロキシル基、置換アミン、グアニジン基、アミジン基、置換チオール、エーテル、ホスフェート、サルフェート基で置換されたフェニル基；インドール基；1~3個の窒素、酸素または硫黄原子を含有するC₁-C₆ 複素環式基、またはそれらの組合わせであることができる。本発明によれば、モノアミン、ジアミド、チオール含有キレート化剤の式における置換誘導体は上に定義した通りである。

より好ましくは、本発明の化合物は下記式の単一のチオールを含有する基を含んで成る金属イオンキレート化剤を含んで成る：



式中AはH、HOOC-、H₂NOC-、-NHOC-、-OOC-、R^c、NOC-またはR^dであり、BはH、SH、-NHR^c、-N(R^c)-またはR^dであり、ZはHまたはR^dであり、XはSH、-NHR^c、-N(R^c)-またはR^dであり、R^a、R^b、R^c およびR^d は独立してH、直鎖状C₁-C₈ アルキル、分枝鎖状C₁-C₈ アルキル、または環状C₃-C₈ アルキルであり、nは0、1または2であり、R^c はC₁-C₄ アルキル、アミノ酸、または2~約10アミノ酸を含んで成るペプチドであり、そして(1) Bが-NHR^cまたは-N(R^c)-である場合、XはSHでありかつnは1または2であり、または-N(R^c)-である場合、BはSHでありかつnは1または2であり、(2) Xが-NHR^cまたは-N(R^c)-である場合、AはHOOC-、H₂NOC-、-NHOC-または-OOC-であり、XはSHでありかつnは0または1であり、(3) BがHまたはR^dである場合、AはHOOC-、H₂NOC-、-NHOC-または-N(R^c)-でありかつXがSHであるとき、Xは-NHR^cまたは-N(R^c)-でありかつXがSHであるとき、Bは-NH(R^d)または-N(R^c)-でありかつnは1または2であり、(4) XがHまたはR^dである場合、AはHOOC-、H₂NOC-、-NHOC-または-N(R^c)-でありかつnは1または2であり、(5) XがHまたはR^dである場合、AはHOOC-、H₂NOC-、-NHOC-または-N(R^c)-でありかつBはSHであり、(6) Zがメチルである場合、Xはメチルであ

な α -アミノ基よりむしろ δ -アミノ基が隣接するアミノ酸のカルボキシシル基に共有結合してペプチド結合を形成している、オルニチン残基を表す； γ -Dabは γ -アミノ基が隣接するアミノ酸のカルボキシシル基に共有結合してペプチド結合を形成している、2,4-ジアミノ酪酸残基を表す；そして β -Dapは β -アミノ基が隣接するアミノ酸のカルボキシシル基に共有結合してペプチド結合を形成している、1,3-ジアミノプロピオン酸残基を表す。アミノ酸の他の略号は慣用のものである。表示「Cysアミド」は残基システインのアミド化された形態を表す。）

最も好ましい態様の金属イオンキレート化剤を製造する方法は、米国特許第5,443,815号、第5,807,537号、第5,814,297号、および第5,866,097号、およびUSN 08/236,402号、08/253,678号、08/253,973号、および08/582,134号。

当業者は認識するように、大部分の金属イオンは前述の金属イオンキレート化剤にキレート化することができる。シグナル標識を発生することができる任意の金属イオンを本発明のベンゾジアゼピン誘導体化合物にキレート化し、こうして本発明の化合物の金属イオン錯体を形成することができる。適当な金属イオンは、コンピュータ化技術において使用するために適当な放射性金属イオン、蛍光性金属イオン、常磁性金属イオン、重金属イオン、希土類イオン、およびその他の金属イオンを含む。放射性金属イオンおよび放射性核種は好ましい。より好ましくは、 γ 放射放射性核種、例えば、 ^{67}Cu 、 ^{68}Ga 、 ^{111}In 、および $^{99\text{m}}\text{Tc}$ は本発明の方法において使用される。最も好ましくは、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ と本発明の化合物との間で形成された錯体を血拴の造影に使用される。

金属イオンキレート化剤は金属イオンと会合してキレートを形成し、そしてキレート化剤の原子は「配位子」として普通に知られている。キレート化技術において、配位子はキレートの配位結合を形成する。本発明によれば、金属イオンが $^{99\text{m}}\text{Tc}$ であるとき、キレートは「 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -キレート」と命名される。 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ は親チオ性金属であり、こうして本発明の $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -キレートは好ましくは $^{99\text{m}}\text{Tc}$ に対する配位共有結合を介して少なくとも1つの硫黄配位子結合を含有する。

本発明の錯体およびキレートは既知の方法に従い形成することができる。例えば、還元剤、例えば、ジチオナイトイオン、第一スズイオンまたは第一鉄イオンの存在下に $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ペルテクネートを化合物と反応させることができる。この方法において、最も好ましい還元剤は塩化第一スズである。あるいは、錯体およびキレートは配位子交換により形成することができる。ここで $^{99\text{m}}\text{Tc}$ と転移配位子として普通に知られている他の化合物との前もって形成した不安定な錯体と本発明の化合物を反応させる。このプロセスにおいて、任意の転移配位子、例えば、酒石酸塩、クエン酸塩、グルコネート、グルコヘプトネート、またはマンニトールを使用することができる。

本発明の化合物を使用して製造された血拴造影剤は、好ましくは医薬組成物として、生きている哺乳動物に静脈内投与される。本発明の化合物は無菌の、無発熱物質の、非経口的許容される水溶液として処方され、この溶液は必要に応じて凍結乾燥された形態で供給され、ユーズーにより再構成されることができる。

本発明の医薬組成物は、本発明の化合物を薬学上許容される希釈剤または担体、例えば、種に適切なアルブミンと組合わせて含んでなる。本明細書において使用するとき、「薬学上許容される希釈剤または担体」は、任意の、すべての溶媒、分散媒質、抗菌および抗真菌剤、等張剤、酵素インヒビター、安定剤、およびその他の成分を含むことができる。薬学的に活性な物質のためにこのような媒質および薬剤を使用することはこの分野においてよく知られている。例えば、塩化ナトリウム注射およびリンガー注射は希釈剤として普通に使用されている。pH、等張性、安定性、およびその他の他に関して、このような非経口的に許容される溶液の調製は当業者の技術の範囲内である。

本発明の化合物および組成物は、キットの成分として提供することができる。このキットは緩衝剤、追加のバイアル、使用説明書、およびその他を含むことができる。本発明のキットは、前もって決定した量の化合物、および必要に応じて、金属イオンがテクネチウム-99mであるとき、還元剤を含有する、密閉されたバイアルを含んで成る。適当量の転移配位子、例えば、酒石酸塩、クエン酸塩、グルコネート、グルコヘプトネートまたはマンニトールをキットに含めることもできる。キットの成分は液体、凍結または乾燥した形態であることができる。

好ましくは、キットの成分は凍結乾燥された形態で提供される。

本発明によれば、本発明のベンゾジアゼピン誘導体化合物を含んでなる医薬組成物から製造した造形剤は、単一単位投与形態で静脈内に、完全にボラスとしてまたは部分的にボラスとして投与し、次いで1〜2時間にわたって注入する。単位投与で注射すべき溶液の量は約0.01ml〜約10mlであり、約0.01mCi〜約100mCiの放射能、好ましくは約1mCi〜約20mCiの放射能を含む。単位投与量中の化合物の気圧は約0.1ml〜約10mg/kg体重の範囲であることができる。静脈内投与後、例えば、*in vivo*における放射能造形により、血栓部位をモニターする。

下記の実施例により、本発明を例示する。これらの実施例は本発明を限定しない。

実施例1

1- [(カルボキシグリシル-グリシル-グリシル-システインアミド)メチル]-4-(2-カルボキシエチル)-7- [(4-アミノフェニル)メチル]-3,4-ジヒドロ-1H-1,4-ベンゾジアゼピン-2,5-ジオンの合成
典型的なベンゾジアゼピン造影剤の合成を後述する。

A. N-Boc-5-ヒドロキシアントラニル酸 [1]

磁気攪拌機を装備した5リットルの3首丸底フラスコの中に、5-ヒドロキシアントラニル酸 (100g, 0.65mol) を入れる。飽和炭酸ナトリウム溶液 (1.5リットル) を攪拌しながら反応フラスコに添加した。二酸化炭素の発生がおさまった後、1.5リットルのテトラヒドロフラン (THF) 中のジ-*t*-ブチルジカルボネート (156.8g, 0.72mol) を反応器に添加し、生ずる2相混合物を完全に混合するために反応器を攪拌した。反応混合物を室温において24時間攪拌し、この時間において1.0リットルのエチルエーテルを添加し、混合物を分液漏斗に移した。水性層をさらに1.0リットルのエチルエーテルで抽出し、2MのH₃PO₄でpH=3.0にした。生成物を水溶液から酢酸エチル (3×10リットル) で抽出した。一緒にした有機相を飽和NaCl溶液で洗浄し、Na₂SO₄上で乾燥し、濾過し、真空濃縮すると、N-Boc-5-ヒドロキシアントラニル酸 (153g, 92.5%の収率) が得られた。

B. N-Boc-5-ベンジルオキシアントラニル酸、ベンジルエステル [2]

乾燥した5リットルの3首丸底フラスコにアルゴン雰囲気下に、水酸化ナトリウム (95%, 36.2g, 1.51mol) を入れた。無水ジメチルホルムアミド (DMF) をカニューレで添加し、次いで注意してN-Boc-5-ヒドロキシアントラニル酸 (150g, 0.59mol) を添加した。反応混合物を氷/水浴で冷却し、反応温度を50℃以下に保持しながら、臭化ベンジル (148ml, 1.24mol) を注射器で添加した。添加が完了した後、反応混合物を45〜50℃において6時間攪拌した。この時において、追加の臭化ベンジルを添加し、反応を45〜50℃においてさらに2時間続けた。酢酸 (20ml) を注意して添加し、反応混合物を丸底フラスコに移し、ほぼ400mlの体積に濃縮した。酢酸エチル (1.0リットル) を添加し、生ずる溶液を存在する固相からデカンタした。フラスコを追加の酢酸エチル (2×50ml) でリンスし、各リンス後にデカンタした。一緒にした有機相を水 (1.0リットル) および飽和NaCl (500ml) で洗浄した。有機相を濾過し、真空濃縮すると、N-Boc-5-ベンジルオキシアントラニル酸、ベンジルエステルが赤味がかった褐色シロップ状物として得られた。粗生成物を抽脂するヘキサン (3リットル) に移し、さらに10分間還流させた。溶液をまだ熱い間に濾過し、48時間冷却すると、72gの生成物が得られた (28%の収率)。

C. 5-ベンジルオキシアントラニル酸、ベンジルエステル、塩酸塩 [3]

N-Boc-5-ベンジルオキシアントラニル酸、ベンジルエステル (70g, 161mmol) を、1.4MのHCl/酢酸エチル溶液 (メタノールを塩化アセチルに添加し、次いで酢酸エチルで希釈することによって調製した) に添加した。反応混合物を室温において21時間攪拌した。0℃に冷却した後、反応混合物をさらに2時間おだやかに攪拌した。結晶質生成物を濾過し、50mlの冷却酢酸エチルで洗浄した。微細の溶媒を高真空下に除去すると、5-ベンジルオキシアントラニル酸、ベンジルエステル、塩酸塩が得られた (53.4g, 86%の収率)。

D. N-(カルボ-1-ブトキシメチル)-5-ベンジルオキシアントラニル酸、ベンジルエステル [4]

飽和重碳酸ナトリウム溶液（1.0リットル）を、4リットルのエルレンマイヤーフラスコに1.0リットルの酢酸エチルと一緒に入れた。混合物を確実する速度で2相混合物を攪拌し、5-ベンジルオキシアントラニル酸、ベンジルエステル、塩酸塩が得られた（50.0g、135mmol）を攪拌した混合物に少しずつ添加した。添加が完結した後、混合物をさらに15分間攪拌した。分液漏斗中で層を分離し、水性層を酢酸エチル（500ml）で抽出した。一緒にした有機相をMgSO₄上で乾燥し、濾過し、真空濃縮すると、遊離塩基が得られ、これをアルゴン雰囲気下で無水DMF（700ml）中に溶解した。2.6-ルチジン（20.0ml、172mmol）を溶液に添加し、次いでt-ブチルプロモアセテート（29.0ml、96mmol）を添加した。反応混合物をアルゴン雰囲気下で70℃において48時間攪拌した。DMFを高真空下に回転蒸発器上で除去し、粗生成物残留物を酢酸エチル（1.0リットル）と水（500ml）との間に分配した。有機層を飽和NaCl（250ml）で洗浄し、Na₂SO₄上で乾燥した。この溶液を濾過し、真空濃縮すると、粗生成物が薄褐色固体として得られた。生成物を7%酢酸エチル/ヘキサンから再結晶化させると、N-（カルボート-ブトキシメチル）-5-ベンジルオキシアントラニル酸、ベンジルエステルが得られた（46.4g、79%の収率）。

E. N-（カルボート-ブトキシメチル）-5-ヒドロキシアントラニル酸 [5]

N-（カルボート-ブトキシメチル）-5-ベンジルオキシアントラニル酸、ベンジルエステル（45.0g、101mmol）を、2リットルの丸底フラスコ中の1:1THF/酢酸エチル（1200ml）中に溶解した。雰囲気水をアルゴンでブラッシュし、10%Pd/C（4.0g）を添加した。反応雰囲気水を素ガスで置換し（4パージャー充填サイクル）、反応混合物を水素のバルーン下に23時間攪拌した。雰囲気水をアルゴンと置換し、セライトのパッドを通して反応混合物を濾過し、セライトパッドをメタノール（250ml）で洗浄した。溶媒を真空除去し、生ずる黄色固体を高真空下に一夜配置すると、N-（カルボート-ブトキシメチル）-5-ヒドロキシアントラニル酸が得られた（27.1g、100%の収率）。

F. N-（カルボベンジルオキシメチル）-5-アミノプロピオン酸、エチルエステル [6]

エチルアクリレート（24.4ml、225mmol）およびグリシン、ベンジルエステル、p-トルエンスルホン酸（50.0g、148mmol）を250mlの丸底フラスコ中で一緒にした。攪拌しながら、注射器を介してトリエチルアミン（24.8ml、178mmol）を添加し、反応混合物を室温において22時間攪拌した。反応混合物を酢酸エチル（660ml）と10%水性Na₂CO₃（300ml）との間に分配した。有機相を水（100ml）および飽和NaCl（100ml）で洗浄した。有機相をMgSO₄上で乾燥し、濾過し、真空濃縮し、次いで高真空下に排気すると、N-（カルボベンジルオキシメチル）-5-アミノプロピオン酸、エチルエステルが黄色油状物として得られた（39.3g、73%の収率）。

F. 1-（カルボート-ブトキシメチル）-4-（2-カルボエトキシエチル）-7-ヒドロキシ-3,4-ジヒドロ-1H-1,4-ベンゾジアゼピン-2,5-ジオン [7]

N-（カルボート-ブトキシメチル）-5-ヒドロキシアントラニル酸（26.7g、100mmol）を、乾燥した2リットルの丸底フラスコ中に入れた。反応雰囲気水をアルゴンでブラッシュし、無水DMF（500ml）中のN-（カルボベンジルオキシメチル）-5-アミノプロピオン酸、エチルエステル（29.0g、109mmol）を添加し、次いでO-（7-アザベンゾジアゼピン）-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート（HATU試薬、39.9g、105mmol）を添加した。トリエチルアミン（42.0ml、301mmol）を添加し、反応混合物を室温においてアルゴンのバルーン下に16時間攪拌した。DMFを高真空下に回転蒸発器上で除去し、残留物を酢酸エチル（1.0リットル）と飽和NaHCO₃（500ml）との間に分配した。有機相を水（500ml）、飽和NaCl（100ml）で洗浄し、MgSO₄で乾燥した。有機相を濾過し、揮発性物質を回転蒸発器上で真空除去し、残留油状物を高真空下に排気すると、油が得られた。この油を9:3酢酸エチル/メタノール（1200ml）中に取り、アルゴン雰囲気

気下に配置した。10%Pd/C(4.0g)を添加し、反応雰囲気水を素ガスで置換した(4バージ充填)。反応混合物をアルゴンのバルーン下に45時間攪拌した。反応雰囲気アルゴンで置換し、懸濁液をセライトのパッドを通して濾過し、これを追加の300mlのメタノールで洗浄した。揮発性物質を真空除去し、残留物を最小量のジクロロメタン中に取り、シリカゲルのクロマトグラフィーにかけ、このカラムを1:1酢酸エチル/ヘキサンで溶離した。粗生成物を含有する画分(Rf=0.17、酢酸エチル/ヘキサン)を一緒にし、溶媒を真空除去すると、1-(カルボ-ト-プトキシメチル)-4-(2-カルボエトキシエチル)-7-ヒドロキシ-3,4-ジヒドロ-1H-1,4-ベンゾジアゼピン-2,5-ジオンが白色固体として得られた(20.2g,50%の収率)。

G. 1-(カルボ-ト-プトキシメチル)-4-(2-カルボエトキシエチル)-7-[(4-シアノフェニル)メチル]-3,4-ジヒドロ-1H-1,4-ベンゾジアゼピン-2,5-ジオン [8]

1-(カルボ-ト-プトキシメチル)-4-(2-カルボエトキシエチル)-7-ヒドロキシ-3,4-ジヒドロ-1H-1,4-ベンゾジアゼピン-2,5-ジオン(19.5g,48mmol)、 α -ブロモ- ρ -トリニトリル(11.3g,58mmol)、および炭酸カリウム(9.0g,65mmol)を丸底フラスコ中に一緒にした。無水DMF(300ml)を添加し、反応混合物を40℃において4日間攪拌した。反応混合物を濾過し、濾液を回転蒸発器上で真空濾過した。残留物を酢酸エチル(500ml)と水(100ml)との間に分配した。有機相を飽和NaCl(50ml)で洗浄し、Na₂SO₄上で乾燥した。揮発性物質を真空下に回転蒸発器上で除去し、残留物をシリカゲルのクロマトグラフィーにかけ、このカラムを5:6酢酸エチル/ヘキサンで溶離した。粗生成物を含有する画分(Rf=0.17、5:6酢酸エチル/ヘキサン)を一緒にし、溶媒を真空下に回転蒸発器上で除去すると、1-(カルボ-ト-プトキシメチル)-4-(2-カルボエトキシエチル)-7-[(4-シアノフェニル)メチル]-3,4-ジヒドロ-1H-1,4-ベンゾジアゼピン-2,5-ジオンが得られた(20.7g,83%の収率)。

H. 1-(カルボ-ト-プトキシメチル)-4-(2-カルボエトキシエチル)-7-[(4-アミノフェニル)メチル]-3,4-ジヒドロ-1H-1,4-ベンゾジアゼピン-2,5-ジオン、アセテート [9]

ガス分散のための入口管および1:1の2MのNaOH/クロックス(Clorox)漂白剤を含有するトラップに接続された出口管を装備した、乾燥した3首底フラスコの中に、1-(カルボ-ト-プトキシメチル)-4-(2-カルボエトキシエチル)-7-[(4-シアノフェニル)メチル]-3,4-ジヒドロ-1H-1,4-ベンゾジアゼピン-2,5-ジオン(16.0g,31mmol)を入れた。フラスコをアルゴンガスでフラッシュし、無水ピリジン(90ml)を添加し、次いでトリエチルアミン(70ml)を添加した。生ずる溶液を硫化水素ガスで飽和させた。入口管および出口管を除去し、反応混合物を55℃〜60℃において21時間加熱した。反応混合物をアルゴンでバージし、揮発性物質を回転蒸発器上で真空下に除去した。残留物を5:4ジクロロメタン/トリニトリル(450ml)中に取り、これをまた回転蒸発器上で真空下に除去した。ジクロロメタン/トリニトリルを使用する処理をもう一度反復した。残留物をアセトン(300ml)中に取り、注射器を介してヨードメタン(5.2ml,84mmol)を添加した。反応混合物を攪拌し、60℃〜65℃に5.5時間加熱した。反応混合物を冷却し、揮発性物質を回転蒸発器上で真空下に除去した。残留物をアルゴン雰囲気下に無水メタノール(200ml)中に取り、酢酸アンモニウム(9.25g,120mmol)を添加した。反応混合物を室温においてアルゴン雰囲気下に21時間攪拌した。揮発性物質を回転蒸発器上で真空下に除去し、残留物をアセトリル(200ml)中に取り、焼結ガラスの漏斗を通して濾過した。反応器を追加のアセトリル(100ml)でリンスし、これをまた焼結ガラスの漏斗を通して濾過した。濾液を回転蒸発器上で真空濃縮し、高真空下に排気すると、1-(カルボ-ト-プトキシメチル)-4-(2-カルボエトキシエチル)-7-[(4-アミノフェニル)メチル]-3,4-ジヒドロ-1H-1,4-ベンゾジアゼピン-2,5-ジオン、アセテートが得られた(18.2g,99%の収率)。

I. 1-(カルボキシメチル)-4-(2-カルボエトキシエチル)-7-[(

4-アミジノフェニル)メチル] -3, 4-ジヒドロ-1H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2, 5-ジオン、塩酸塩 [10]

1- [(カルボート-ブトキシメチル) -4- (2-カルボエトキシエチル) -7- [(4-アミジノフェニル)メチル] -3, 4-ジヒドロ-1H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2, 5-ジオン、アセテート (17.7 g, 30 mmol) を乾燥丸底フラスコの中に入れ、注射器を介して4 MのHCl / ジオキサンを添加した。反応混合物を室温において1.5時間攪拌し、次いで無水エチルエーテル (1.0リットル) の攪拌した溶液に滴下した。添加が完了した後、生ずる懸濁液をさらに15分間攪拌し、アルゴンガスのブランケット下に通過した。収集した固体を無水エチルエーテルで洗浄し、丸底フラスコに移し、高真空下に乾燥すると、1- [(カルボキシメチル) -4- (2-カルボエトキシエチル) -7- [(4-アミジノフェニル)メチル] -3, 4-ジヒドロ-1H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2, 5-ジオン、塩酸塩が白色固体状物として得られた (14.2 g, 93%の収率)。

¹H NMR (CD₃OD) : 1.25 ppm (t, 3H) ; 2.70 ppm (m, 2H) ; 3.70-4.21 ppm (m, 4H) ; 4.12 (q, 2H) ; 4.50 ppm (s, 2H) ; 5.39 ppm (s, 2H) ; 7.20 ppm-7.40 ppm (m, 3H) ; 7.71 ppm (d, 2H) ; 7.83 ppm (d, 2H)。

J. Fmoc-グリシル-グリシル-グリシル-S-トリチルシステイニル-リンクアミド樹脂 [11]

Fmoc-リンク (Link) アミド樹脂 (12.5 g, 0.66 mmol / g, 8.25 mmol) を順次にN-Fmoc-S-トリチルシステイン、Fmoc-グリシン、Fmoc-グリシン、Fmoc-グリシン、およびFmoc-グリシンも下記の固相ペプチド合成プロトコルに従いカップリングさせた：樹脂を20%ペプチジン / DMF (2回、5分、次いで15分) で処理することによって、N-末端のFmoc基を除去した。樹脂をDMF (4 × 1分) で洗浄した後、生ずる樹脂-担持N-末端遊離アミンをDMFの中に懸濁させ、1:1の2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル) -1, 1, 3, 3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート / N-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HA

TU/HOBt) およびジイソプロピルエチルアミン (8.3 ml, 47.6 mmol) の0.45 M溶液で前もって活性化したN-Fmoc-S-トリチルシステイン (13.7 g, 23.4 mmol) と反応させた。

樹脂をDMF (3回)、ジクロロメタン (3回)、およびDMF (3回) で洗浄した。Fmoc-グリシン (7.0 g, 23.5 mmol) を同様に3つの順次の手順において樹脂担持ペプチドと反応させて、Fmoc-グリシル-グリシル-グリシル-S-トリチルシステイニル-リンクアミド樹脂を生成した。樹脂をジクロロメタン (3回) で洗浄し、真空乾燥した。樹脂の小さい部分についての置換分析は、樹脂置換が0.13 mmol / gであることを示した。

K. 1- [(カルボキシグリシル-グリシル-グリシル-S-トリチルシステインアミド)メチル] -4- (2-カルボエトキシエチル) -7- [(4-アミジノフェニル)メチル] -3, 4-ジヒドロ-1H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2, 5-ジオン、トリフルオロアセテート [12]

Fmoc-グリシル-グリシル-グリシル-S-トリチルシステイニル-リンクアミド樹脂 (53.4 g, 6.94 mmol) を20%ピペリジン / DMF (75 ml, 5分、次いで15分) (2回) で処理し、DMF (2回) で洗浄した。別々に、1- [(カルボキシメチル) -4- (2-カルボエトキシエチル) -7- [(4-アミジノフェニル)メチル] -3, 4-ジヒドロ-1H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2, 5-ジオン、塩酸塩 (5.9 g, 11.36 mmol) をアルゴン雰囲気下に乾燥丸底フラスコの中に入れ、無水DMF (75 ml) 中に溶解した。この溶液を攪拌し、0℃に冷却し、4-メチルモルホリン (1.01 ml, 9.2 mmol) で処理し、次いでイソブチルクロロホルメート (1.13 ml, 8.7 mmol) を滴下した。添加が完了した後、この溶液を0℃においてさらに5分間攪拌し、前述したように発生させた樹脂-担持ペプチド遊離アミンに添加した。この樹脂をDMF (6回) およびジクロロメタン (3回) で洗浄した。樹脂を3回トリフルオロ酢酸 (40 ml) で10分間処理し、各回脱保護混合物を丸底フラスコの中に排出した。樹脂を2回ジクロロメタン (75 ml) で洗浄した。ジクロロメタン洗液をトリフルオロ酢酸脱保護混合物と一緒にし、揮発性物質を回転蒸発器上で真空中に除去した。樹脂を無水クロロホルムで数

回処理し、各回クロホルムを回転蒸発器上で真空下に除去した。システインスルフィドリルへのトリチル基の結合を示す、残基のオレンジ色/黄色が消失するまで、これを反復した。粗生成物を高真空下に排気すると、1-[(カルボキシグリシル-グリシル-グリル-S-トリチルシステインアミド)メチル]-4-(2-カルボエチキエチル)-7-[(4-アミノフェニル)メチル]-3,4-ジヒドロ-1H-1,4-ベンゾジアゼピン-2,5-ジオン、トリフルオロアセテート(8.4g)が得られた。この生成物を逆相C18 HPLCにより精製した。このカラムに粗生成物のDMF溶液(70mg/ml)を負荷し、90%アセトニトリル/水(溶媒B)中の0.1%TFAおよび水(溶媒A)中の0.1%TFAの線形勾配で溶離した。勾配は40分にわたって20%B/A~45%B/A~45であった。画分を逆相C18 HPLCにより分析し、純粋な生成物を含有する画分と一緒にし、凍結乾燥させると、1-[(カルボキシグリシル-グリシル-グリル-S-トリチルシステインアミド)メチル]-4-(2-カルボエチキエチル)-7-[(4-アミノフェニル)メチル]-3,4-ジヒドロ-1H-1,4-ベンゾジアゼピン-2,5-ジオン、トリフルオロアセテートが白色粉末として得られた(2.41g, 2.17ml、31%の収率)。エレクトロスプレー質量分析は、998の分子イオンピーク(M+H⁺)を示した(C₃₂H₅₆N₉O₁₀S)についての理論値は998.4である)。

1-[(カルボキシグリシル-グリル-S-トリチルシステインアミド)メチル]-4-(2-カルボエチキエチル)-7-[(4-アミノフェニル)メチル]-3,4-ジヒドロ-1H-1,4-ベンゾジアゼピン-2,5-ジオン、トリフルオロアセテート [13]

1-[(カルボキシグリシル-グリル-S-トリチルシステインアミド)メチル]-4-(2-カルボエチキエチル)-7-[(4-アミノフェニル)メチル]-3,4-ジヒドロ-1H-1,4-ベンゾジアゼピン-2,5-ジオン、トリフルオロアセテート(2.38g, 2.14mmol)を丸底フラスコの中に入れ、メタノール(100ml)中に溶解した。攪拌した溶液を1.0Mの水酸化リチウムの水溶液(8.7ml, 8.7mmol)で室温に

において20時間処理した。トリフルオロ酢酸(0.67ml, 8.7mmol)を添加して反応を急冷し、揮発性物質を回転蒸発器上で真空下に除去した。残留物をトリフルオロ酢酸/トリエチルシラン/水の9:1:4:5混合物(100ml)で45分間処理した。揮発性物質を回転蒸発器上で真空下に除去した。残留物を90%アセトニトリル/水中の0.1%TFA(20ml)中に溶解し、攪拌した溶液を水中の0.1%TFA(200ml)で希釈した。セライトのパッドを通して生ずる沈澱を濾過し、これを追加の水中の0.1%TFA(100ml)で洗浄した。一緒にした濾液を調製用逆相C18 HPLCにより精製した(少しづつ)。このカラムを40分かけて100%A~15%B/Aの線形勾配で溶離した(水中の0.1%TFAは溶媒Aであり、そして90%アセトニトリル/水中の0.1%TFAである)。画分を逆相C18 HPLCにより分析し、純粋な生成物を含有する画分と一緒にし、凍結乾燥させると、1-[(カルボキシグリシル-グリル-S-トリチルシステインアミド)メチル]-4-(2-カルボキシエチル)-7-[(4-アミノフェニル)メチル]-3,4-ジヒドロ-1H-1,4-ベンゾジアゼピン-2,5-ジオン、トリフルオロアセテートが白色粉末として得られた(1.08g, 12.4mmol, 58%の収率)。

実施例2

テクネチウム-99mで放射能標識化するブラシ-ボバイアル法

0.9%生理食塩水中に溶解した100μlの1mg/mlのTFA塩溶液としてほぼ100μgの実施例1のベンゾジアゼピン誘導体化合物を、「ブラシ-ボバイアル」に添加した。このブラシ-ボバイアルは、凍結乾燥した5mgのナトリウムグルコヘプタネート水和物、50μgの塩化第一スズ水和物、および1000μgのナトリウムエデレート水和物を含有した。次いで、全体積が1.1mlになるように、このバイアルを^{99m}Tc-ナトリウムペルテクネート(30~50mCi)および生理食塩水で再構成した。再構成後、バイアルを室温において30分間インキュベートした。

^{99m}Tc標識化ベンゾジアゼピン誘導体の純度を、下記の条件下に逆相分析用HPLCにより測定した: ウォーターズ (Waters) デルタ・パッ

クC18、5 μ g、3.9mm \times 150mm分析用カラムに、各放射能標識化ペプチドを負荷し、ペプチドを1.2ml/分に等しい溶媒流速で溶離した。12 \sim 25%溶媒B/溶媒Aの線形勾配（溶媒Aは水中の0.1%（v/v）トリフルオロ酢酸（TFA）であり、そして溶媒Bは90/10（v/v）アセトニトリル/水中の0.1%（v/v）TFAである）を20分かけて使用し、次いで25 \sim 100%溶媒B/溶媒Aの線形勾配を4分かけて使用し、そして100%溶媒B/溶媒Aを3分かけて使用して、勾配溶離を実行した（方法1）。

コンピュータ化データ収集および解析システム（Waters Millennium）にリンクしたインライン放射分析検出器を使用するHPLC法において、放射性成分を検出した。^{99m}Tc-グルコヘプテート、^{99m}Tc-エデテート、および^{99m}Tc-ナトリウムペルテクネートはこれらの条件下に1 \sim 4分に溶出するが、^{99m}Tc-標識化ベンゾジアゼピン誘導体は非常に長い時間後に溶出する。放射能化学的純度（主^{99m}Tc生成物ピークの面積%により決定される）は \geq 90%であった。

また、^{99m}Tc-標識化ベンゾジアゼピン誘導体の純度をTLC品質コントロール分析により測定した。放射能標識化ペプチドの試料を2つのゲルマノ（Gelman）TLC-SGストリップの各々の原点にスポットした。一方のストリップの各々を飽和生理食塩水（SAS）および1:1（v/v）メタノール:0.1M酢酸アンモニウム（MAM）中で現像し、乾燥させた。SASストリップをRf0.75において切断し、そしてMAMストリップをRf0.40において切断した。ストリップの部分を線量カリブレターにおいて放射能について計数し、そして各ストリップの上部および底部の部分の活性百分率を計算した。各試料の放射化学的純度を次のようにして計算した：

$$\text{TLCによる純度} = \text{底部（SAS）\%} - \text{底部（MAM）\%}$$

TLCによる放射化学的純度は \geq 90%であった。

実施例3

テクネチウム-99mで放射能標識化する処方キット法

成分を適当な比において水溶液中で一緒にし、pHをpH7.4に調節し、1.0mlをガラスバイアルの中に分散させ、凍結乾燥することによって、処方キ

ットを調製した。1ml（1つのバイアル）が下記の成分を含有するように、成分を水溶液中に溶解した：50 μ gの実施例1のベンゾジアゼピン誘導体および25mgのナトリウムグルコヘプテート二水和物、50 μ gの塩化第一スズ二水和物、および5mgのL-メチオニン。全体積が1.0mlであるように、処方キットを^{99m}Tc-ナトリウムペルテクネート（45 \sim 55mCi）および生理食塩水で再構成した。再構成後、処方キットを沸騰する水浴中で100 $^{\circ}$ Cにおいて10分間インキュベートし、室温において20分間放冷した。

^{99m}Tc-標識化ベンゾジアゼピン誘導体の純度を、下記の条件下に逆相分析用HPLCにより測定した：ゾルパックス（Zorbax）300SB C18、4 μ g、4.6mm \times 250mm分析用カラムに、各放射能標識化ペプチドを負荷し、ペプチドを1.2ml/分に等しい溶媒流速で溶離した。23 \sim 46%溶媒B/溶媒Cの線形勾配（溶媒Cは水中の5mMのテトラブチルアンモニウムホスフェートpH7.5であり、そして溶媒Dは60/40アセトニトリル/水中の5mMのテトラブチルアンモニウムホスフェートpH7.5である）を20分かけて使用し、次いで46 \sim 100%溶媒D/溶媒Cの線形勾配を5分かけて使用し、そして100%溶媒D/溶媒Cを3分かけて使用して、勾配溶離を実行した（方法2）。

実施例2において方法1について記載した同一検出法により、HPLC方法2において放射性成分を検出した。処方キット調製物から得られた放射化学的純度（主^{99m}Tc生成物ピークの面積%により決定される）は、 $>$ 6時間について \geq 90%であった。

また、実施例2に記載するようなTLC品質コントロール分析により、^{99m}Tc-標識化ベンゾジアゼピン誘導体の純度を測定した。

実施例1において合成された^{99m}Tc-標識化ベンゾジアゼピン誘導体のHPLCおよびTLC分析の結果を表1に示す。

【表1】

表1

***Tc標識化ベンゾジアゼピン誘導体のHPLCおよびTLC分析結果

	TLC純度 (%)	HPLC法	HPLC保持時間 (分)	HPLC純度 (%)
実施例2	99	1	10.8、12.0	92
実施例3*	99	2	11.8、13.7	94
	100	2	11.6、13.5	94

- ・ 2つのエントリ-は処方キットの2つの異なるロットを表す。

実施例 4

in vitro 研究

*** T c-ベンゾジアゼピン誘導体を実施例2に記載されているよう
に製造した。

血小板に富んだ血漿 (P R P) の調製。すべての実験において、実験の日にク
エン酸添加ヒト血液からの血小板を分離した。医師による十分な説明と患者によ
る自主的な同意、または選択を得た後、健康な成人ボランティアの前前部脈から
27 m lの血液を抽出して、3 m lのクエン酸ナトリウム (3. 8 % w / v、p
H 7. 4) を含有するポリプロピレン注射器の中に入れた。生物学的流体を取り
扱う普遍的予防手段に従った。クエン酸塩添加血液を50 m lの円錐形遠心管に
移し、900 r p m (160×g) において10分間遠心してP R Pを得た。

洗浄した血小板。P R Pを2, 200 r p m (1, 400×g) において12
分間遠心することによって、洗浄した血小板を調製した。血小板含量が低い血漿
(P P P) をデカントし、生ずるペレットを変性タイロード緩衝液の中に懸濁さ
せた。P P Pをデカントし、廃棄した。変性タイロード緩衝液 (0. 8 m l / m
lのものP R P) を血小板ペレットの上に直ちに層状化し、プロスタグランジ
ンE₁ (P G E₁ : 1 μ lの40 μ Mの溶液 / m lのタイロード緩衝液) を添加
して血小板の活性化を防止した。 (M c L a n e M A, K o w a l s k a M

A, S i l v e r L, S h a r r i l S JおよびN i e w i a r o w s k i
S. (1994) B i o c h e m. J. 201 : 429-426)。ペレット
をプラスチック製バスツールピペットで再懸濁させた。遠心工程を反復して血小
板を洗浄し、結合アッセイのために血小板を150 m lのタイロード緩衝液の中
に希釈した。

ポリエチレニン処理フィルター。アッセイ前に少なくとも1時間フィルタ
ー (G F / C) を10 m MのT r i s - H C l (p H 9. 1) ポリエチレニミ
ン (0. 5 %) およびP 829 (0. 001 %) 中の予備ソーキングして、フィ
ルターに対する^{99m} T c標識化ベンゾジアゼピン誘導体の非特異的結合
を減少させた。

洗浄した血小板に対する^{99m} T c-ベンゾジアゼピン誘導体の結合。
^{99m} T c-ベンゾジアゼピン誘導体 (50, 30, 10, 7, 5, 3,
1, 0, 7, 0, 5, 0, 3, 0, 1, および0. 07 n Mの最終濃度) を含有
するタイロード緩衝液の全体積250 μ lにおいて撹拌水中で37℃において6
0分間シラン化ガラス管の中で、血小板をインキュベートした。「活性化」血小
板に対する^{99m} T c-ベンゾジアゼピン誘導体の結合を測定するために
、A D P (20 μ Mの最終濃度) の0. 5 m Mの溶液の10 μ lのアリコート、
および250 m MのC a C l₂ およびM g C l₂ の1 : 1混合物の10 μ lのア
リコートを適当な管に添加した。過剰の非標識化ベンゾジアゼピン誘導体
(100 μ M) を完全に飽和したG P I I b / I I I a レセプターに添加すること
によって、非特異的結合を測定した。真空源 (15~20 m m H g) に接続さ
れたブランドル・セル (B r a n d e l C e l l 収集器 (カタログNo. S M
24 T, B r a n d e l、マリランド州ガイサースバーグ) を使用して、処理
したG F / Cガラスファイバーのフィルター (カタログNo. F P 24-C F /
C, B r a n d e l、マリランド州ガイサースバーグ) を通して濾過すること
によって、血小板に結合した^{99m} T c-ベンゾジアゼピン誘導体を遊離
^{99m} T c-ベンゾジアゼピン誘導体から分離した。次いでフィルターを
9 m lの10 m MのT r i s - H C l 緩衝液p H 7. 8 (4℃) で洗浄し、ガン
マカウンタ-中で放射能について計数した。

計算。過剰の非標識化ベンゾジアゼピン誘導体の存在下の非特異的結合を過剰のベンゾジアゼピン誘導体の非存在下に測定した全結合から減算することによって、^{99m}Tc-ベンゾジアゼピン誘導体の特異的結合を計算した。下記の文献に記載されているように、データをスキッチャードプロットとしてプロットした：Bylung BDおよびYamamura H1、Methods for receptor binding, Ravens Press Ltd. (ニューヨーク州、1990) pp. 1-32。データをカレイダグラフ (Kaleidagraph) (Synergy Software Inc.) ソフトウェアパッケージにおいて線形回帰関数と適合させた。K_a 値を勾配の負逆数として計算した。統計。インスター・プログラム (Instar Program) (GraphPad Software、カリフォルニア州サンディエゴ) からの対合スチューデントのt検定を使用して2因子の各々における2因子のベルの間で、各応答変数を比較した。帰無仮説の棄却のために、限界p値を0.05に設定した。応答変数について：K_a；レベル1：基底 (ADPなし)；レベル2。活性化 (ADP)、因子レベルを同一個体から単離した血小板において比較した。実験を同時に実施した。^{99m}Tc-ベンゾジアゼピン誘導体の結合についての平均K_aは、それぞれ、30.5nMおよび13.5nMであった。こうして、より多くの^{99m}Tc-ベンゾジアゼピン誘導体は活性化血小板に結合した。試験したすべての濃度における活性化血小板に対する結合の平均増加倍数は1.8であり、1.2~2.3倍の範囲であった。K_aが誘導されたスキッチャードプロットから得られたデータを表2に要約する。

【表2】

表2

ヒト血小板に対する結合についてのK_a値 (nM)

	テクネチウム Tc 99m P424	
	基底	ADP
被検体1	32	15
被検体2	20	12
被検体3	47	20
被検体4	23	7
平均	30.5±6	13.5±3

これらのデータが証明するように、本発明に従って製造した^{99m}Tc-ベンゾジアゼピン誘導体は静止血小板よりも活性化された血小板により高い効力で結合する。

実施例5

^{99m}Tc-ベンゾジアゼピン誘導体
イヌモデルにおける^{99m}Tc-標識化ベンゾジアゼピン誘導体
を使用する深部脈の血栓症のin vivo造影

3匹の雄種のイヌ (25~35ポンド、一夜断食させた) をケタミンとアセプロザミンとの組合わせで筋肉内鎮静させ、次いでナトリウムペントバルビタルで静脈内麻酔した。各動物において、18ゲージの血管カテーテルを右大腿静脈の遠位半分に挿入し、8mmのDacron[®]の巻いたステンレス鋼血栓症コイル (Cook Co.、インディアナ州ブルーミントン) を大腿静脈のほぼ中間大腿骨に配置した。カテーテルを除去し、縫合した創傷およびコイルの配置をX線で証明された。次いで動物を一夜回復させた。

コイルの配置後1日に、各動物を再麻酔し、静脈内生理食塩水点滴を各前足に配置し、膀胱カテーテルを挿入して尿を収集した。低エネルギーの、万能コーンターを装備し、^{99m}Tcに対する感光ピークを有するガンマカメラ下に動物を仰臥させて配置した。

実施例1のベンゾジアゼピン誘導体を^{99m}Tc [185~370mB

表3
肺血栓および深静脈血栓のイメージ

	足血栓	肺血栓
血栓/バックグラウンド ¹	4.2 (n=2)	1.3 (n=1)
10%/g血栓	0.050±0.020	0.15±0.048
血栓/血液 ²	9.1±4.6	27±9
血栓/筋肉 ³	30±15	—
血栓/正常の肺 ³	—	29±9
血栓重量	430±210mg	30±15mg

¹ 平均±標準偏差
² 問題の画像の解析から
³ 注射された投与量%/g (1D%/g) の比

これらの結果が証明するように、本発明のTc-99m標識化ベンゾジアゼド
ンジオン誘導体を使用し、肺血栓および深静脈血栓を急速にかつ効率よくin
vivoにおいて検し出すことができる。
以上の開示は本発明のある種の特定の態様を強調し、そしてすべての変更また
は同等の態様は添付された特許請求の範囲に記載される本発明の精神および範囲
内に入ることを理解すべきである。

q (5〜10mCi) で標識化し、1つの前足静脈内ラインの中にその挿入点
において順次に注射した。ガンマカメラの造影を注射と同時に開始した。心臓
上の前部画像を動力学的研究として最初の15分にわたって獲得し(10秒の画
像の獲得)、次いで注射後1、2、3および4時間に静止画像を獲得した。足上
の前部画像を500、000計数または20分(どちらかがより短くても)の間ほ
ぼ10〜20分に、そして注射後1、2、3および4時間に獲得した。膀胱の上
に鉛シールドを配置して、足の画像を収集した。

最終画像後、各動物をペントバルビタルで深く麻酔した。ヘパリン化注射器
を使用して、2つの血液試料を収集し、次いで心臓内またはボラス静脈内注射
により安楽死投与量の飽和塩化カリウム溶液を投与した。次いで血栓を含有する
大腸静脈、対側(対照)足の静脈の同様な切片、血栓に対して近位の静脈の切片
、および大腿筋肉の試料を注意して解剖した。血栓、コイルおよびコリメーター
Dacron繊維を血管から解剖除去した。血栓、生理食塩水洗浄血管の試料、
コイルおよびコリメーターDacron繊維を分離し、そして各試料を前もって
秤量した試験管の中に入れた。試料を秤量し、Tc-99mチャンネルにおいて
ガンマウェルカウンタ中で、注射した投与量と一様に計数した。

安楽死直前に得られた血栓および血液における新鮮な血栓重量、注射投与量の
百分率(1D%) / g、および血栓/血液および血栓/筋肉の比を決定した。コ
ンピューターに記憶させた画像から、血栓および隣接する筋肉の上に描いた問題
の領域において測定した計数/総量の解析により、血栓/バックグラウンド比を
決定した。これらの実験からの組織のデータを表3に示す。

【表3】

【手続補正書】

【提出日】平成13年10月19日（2001.10.19）

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

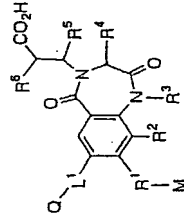
【発明の名称】 血栓造影用ベンゾジアゼピン誘導体

【特許請求の範囲】

【請求項1】 金属イオンキレート化剤に共有結合された糖タンパク質IIb／IIIaレセプター結合性ベンゾジアゼピン誘導体を含んで成り、血小板凝集阻害についての標準アッセイにおいて測定したとき、ヒト血小板凝集を阻害する実質的な効力を保持する、化合物。

【請求項2】 下記式を有する請求項1に記載の化合物：

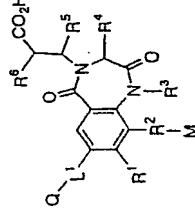
【化1】



式中R¹はC₁～C₆低級アルキルであり、R²、R³、R⁴、R⁵、およびR⁶は各々独立してH、C₁～C₆低級アルキル、置換アルキル、アリール、置換アリール、またはそれらの組合わせであり、L¹は結合部分であり、Qは正に帯電した窒素含有部分であり、そしてMは金属イオンキレート化剤である。

【請求項3】 下記式を有する請求項1に記載の化合物：

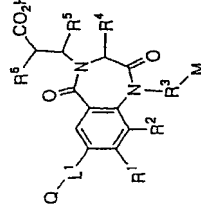
【化2】



式中R²はC₁～C₆低級アルキルであり、R¹、R³、R⁴、R⁵、およびR⁶は各々独立してH、C₁～C₆低級アルキル、置換アルキル、アリール、置換アリール、またはそれらの組合わせであり、L¹は結合部分であり、Qは正に帯電した窒素含有部分であり、そしてMは金属イオンキレート化剤である。

【請求項4】 下記式を有する請求項1に記載の化合物：

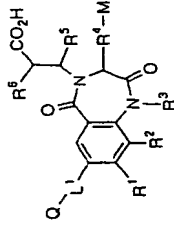
【化3】



式中R³はC₁～C₆低級アルキルであり、R¹、R²、R⁴、R⁵、およびR⁶は各々独立してH、C₁～C₆低級アルキル、置換アルキル、アリール、置換アリール、またはそれらの組合わせであり、L¹は結合部分であり、Qは正に帯電した窒素含有部分であり、そしてMは金属イオンキレート化剤である。

【請求項5】 下記式を有する請求項1に記載の化合物：

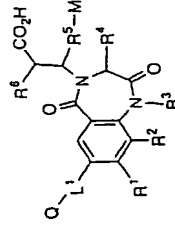
【化4】



式中 R^1 は C_1 ～ C_6 低級アルキルであり、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 および R^7 は各々独立して H 、 C_1 ～ C_6 低級アルキル、置換アルキル、アリール、置換アリール、またはそれらの組合わせであり、 L^1 は結合部分であり、 Q は正に帯電した窒素含有部分であり、そして N は金属イオンキレート化剤である。

【請求項6】 下記式を有する請求項1に記載の化合物：

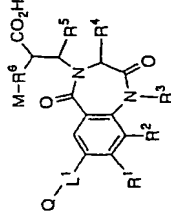
【化5】



式中 R^1 は C_1 ～ C_6 低級アルキルであり、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 および R^7 は各々独立して H 、 C_1 ～ C_6 低級アルキル、置換アルキル、アリール、置換アリール、またはそれらの組合わせであり、 L^1 は結合部分であり、 Q は正に帯電した窒素含有部分であり、そして N は金属イオンキレート化剤である。

【請求項7】 下記式を有する請求項1に記載の化合物：

【化6】

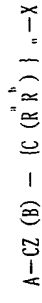


式中 R^1 は C_1 ～ C_6 低級アルキルであり、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 および R^7 は各々独立して H 、 C_1 ～ C_6 低級アルキル、置換アルキル、アリール、置換アリール、またはそれらの組合わせであり、 L^1 は結合部分であり、 Q は正に帯電した窒素含有部分であり、そして N は金属イオンキレート化剤である。

【請求項8】 キレート化剤が単一のチオール含有基を含んでなる、請求項1に記載の化合物。

【請求項9】 単一のチオール含有基が下記式を有する、請求項8に記載の

化合物：

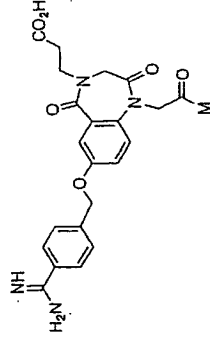


式中 A は H 、 $HOOC-$ 、 $-NHOC-$ 、 $-OOC-$ 、 R^1-NOC- または R^2 であり、 B は H 、 SH 、 $-NHR^1$ 、 $-N(R^1)-$ または R^2 であり、 Z は H または R^1 であり、 X は SH 、 $-NHR^1$ 、 $-N(R^1)-$ または R^2 であり、 R^1 、 R^2 、 R^3 および R^4 は独立して H 、直鎖状 C_1 ～ C_6 アルキル、分枝鎖状 C_1 ～ C_6 アルキル、または環状 C_1 ～ C_6 アルキルであり、 n は0、1または2であり、 R^1 は C_1 ～ C_6 アルキル、アミノ酸、または2～約10アミノ酸を含んで成るペプチドであり、そして(1) B が $-NHR^1$ または $-N(R^1)-$ である場合、 X は SH でありかつ n は1または2であり、(2) X が $-NHR^1$ または $-N(R^1)-$ である場合、 B は SH でありかつ n は1または2であり、(3) B が R^2 または R^3 である場合、 A は $HOOC-$ 、 $-NHOC-$ 、 $-OOC-$ または $-OOC-$ であり、 X は SH でありかつ n は0または1であり、(4) A が NH または R^1 である場合、 B が SH であるとき、 X は $-NHR^1$ または $-N(R^1)-$ でありかつ X が SH であるとき、 B は $-NHR^1$ または $-N(R^1)-$ でありかつ n は1または2であり、(5) X が NH または R^1 である場合、 A は $HOOC-$ 、 $-NHOC-$

、-NHOC-または-OOC-でありかつBはSHであり、(6) Zがメチルである場合、Xはメチルであり、AはHOOC-、H NOC-、-NHOC-または-OOC-でありかつBはSHでありかつnは0であり、そして(7) がBがSHである場合、XはSHではなくそしてXがSHであるとき、BはSHではない。

【請求項10】 下記式の化合物：

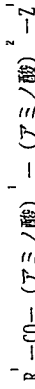
【化7】



式中Mは金属イオンキレート化剤である。

【請求項11】 Mが下記の基から成る群から選択される、請求項10に記載の化合物：

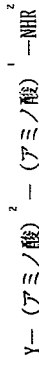
a)



式中 (アミノ酸) および (アミノ酸) は各々独立してチオール基を含まない任意の第一級α-またはβ-アミノ酸であり、Z¹はシステイン、ホモシステイン、イソシステイン、ベニシルアミン、2-メルカプトエチルアミン、2-メルカプトプロピルアミン、2-メルカプト-2-メルカプトプロピルアミン、および3-メルカプトプロピルアミンから成る群から選択され、そしてR¹は低級(C¹-C⁴)アルキルであるか、あるいはR¹-COはアミノ酸、ペプチド、または(aa)-ペプチドであり、ここでZ¹はシステイン、ホモシステイン、イソシステインまたはベニシルアミンであるとき、Z¹はヒドロキシル基、NR¹R²基(ここでR¹およびR²の各々は独立してH、結合、低級(C¹-C⁴)アルキルである)、アミノ酸または2-10アミ

ノ酸を含んで成るペプチドに共有結合されたカルボニル基である；

b)



式中 (アミノ酸) および (アミノ酸) は各々独立してチオール基を含まない任意の第一級α-またはβ-アミノ酸であり、Yはシステイン、ホモシステイン、イソシステイン、ベニシルアミン、2-メルカプトアセテート、2-メルカプトプロピオネート、2-メルカプト-2-メルカプトプロピオネート、および3-メルカプトプロピオネートから成る群から選択され、そしてR¹はH、結合、低級(C¹-C⁴)アルキルであり、そしてNHR¹はアミノ酸、ペプチド、または(aa)-ペプチドであり、ここでYはシステイン、ホモシステイン、イソシステインまたはベニシルアミンであるとき、Yは-H、アミノ酸、ペプチド、または(aa)-ペプチドに共有結合されたアミノ基を含んで成る。

【請求項12】 Mが-Gly-Gly-Cys、-Gly-Gly-Cys-Asp、Gly-Gly-Cys-Gly-Cys-Gly、-Gly-Gly-Gly-Cys(配列番号1)、-Gly-Gly-Gly-Cys-Asp(配列番号1)、Arg-Gly-Cys、-(ε-Lys)-Gly-Cys、-(δ-Orn)-Gly-Cys、-(γ-Dab)-Gly-Cys、および-(β-Dab)-Lys-Cysから成る群から選択される、請求項10に記載の化合物。

【請求項13】 Mが-Gly-Gly-Gly-Cys-Asp(配列番号1)である、請求項10に記載の化合物。

【請求項14】 1-[(カルボキシグリシル-グリシル-グリシル-グリシル-システインアミド)メチル]-4-(2-カルボキシエチル)-7-[(4-アミノフェニル)メチル]-3,4-ジヒドロ-1H-1,4-ベンゾジアゼピン-2,5-ジオントリフルオロアセテート

を含んで成る医薬組成物。
【請求項15】 Tcを更に含んで成る、請求項14に記載の医薬組成物。
【請求項16】 γ放射放射性核種と化合物とを含んでなり、前記化合物は金属イオンキレート成分に共有結合された糖タンパク質(1b/11a)レセプター結合性ベンゾジアゼピンを含んでなり、ここで前記化合物は血小板凝集アッセイの標準阻害において測定したとき、ヒト血小板凝集を阻害する実質的な効力を保

持する、シンチグラフィック造影剤。

【請求項17】 放射性核種が^{99m}Tcである、請求項16に記載のシンチグラフィック造影剤。

【請求項18】 γ 放射放射性核種と化合物とを含んでなり、前記化合物は金(I)イオンキレート化成分に共有結合された配タンパク質11b/111a1aレセプター結合性ベンゾジアゼピンを含んで成り、ここで前記化合物は血小板凝集アッセイの標準阻害剤において測定したとき、ヒト血小板凝集を阻害する実質的な効力を保持する、錯体。

【請求項19】 放射性核種が^{99m}Tcである、請求項18に記載の錯体。

【請求項20】 金(I)イオンキレート化成分に共有結合された配タンパク質11b/111a1aレセプター結合性ベンゾジアゼピンを含んで成る化合物の^{99m}Tcキレート：ここで

a) 血小板凝集アッセイの標準阻害剤において測定したとき、前記化合物はヒト血小板凝集を阻害する実質的な効力を保持する；そして

b) 前記キレートは^{99m}Tcに結合した少なくとも1つの硫黄を含有する。

【請求項21】 有効診断量の請求項15に記載の組成物を哺乳動物の体に投与し、そして血栓に局在化した放射能を検出する工程を含んでなる、哺乳動物の体における血栓を検出する方法。

【請求項22】 有効診断量の請求項17に記載の造影剤を哺乳動物の体に投与し、そして血栓に局在化した放射能を検出する工程を含んでなる、哺乳動物の体における血栓を検出する方法。

【請求項23】 有効診断量の請求項19に記載の錯体を哺乳動物の体に投与し、そして血栓に局在化した放射能を検出する工程を含んでなる、哺乳動物の体における血栓を検出する方法。

【請求項24】 有効診断量の請求項20に記載のキレートを哺乳動物の体に投与し、そして血栓に局在化した放射能を検出する工程を含んでなる、哺乳動物の体における血栓を検出する方法。

【請求項25】 a) 前もって決定した量の1-[(カルボキシメチル)グリシル-グリシル-スチスデインアミド)メチル]-4-(2-カルボキシエチル)

-7-[(4-アミノジフェニル)メチル]-3,4-ジヒドロ-11-1,4-ベンゾジアゼピン-2,5-ジオントリフルオロアセテート；および

b) 還元剤；

を含有する密閉されたバイアルを含んで成るキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、血栓の診断的造影の分野に関する。さらに詳しくは、本発明は血栓を造影する正に帯電したに関する。

発明の背景

血栓は心臓血管系内に形成する血液凝固物である。血栓の形成、すなわち、血栓症は、血管、例えば、静脈、動脈、または毛細血管の局所的閉塞を引き起こすことがある。静脈の血栓は、通常、より下方肢において形成し、そして血管壁の炎症または静脈の閉塞を引き起こすことによって急性症候を生成することがある。静脈血栓片は、また、心臓血管系を通して循環して、遠い部位、例えば、肺において栓、または塞栓を形成することがある。動脈血栓は普通に脈管性疾患、例えば、アテローム性動脈硬化症に関連づけられ、そして血流を閉塞するか、あるいは毛細血管を塞栓することによって組織の虚血（局所的貧血）を生成することがある。また、血栓は心臓において、例えば、炎症または損傷した弁上に、心筋梗塞に隣接する組織上に、損傷した房内に、または人工弁上に形成することがある。

【0002】

すべての血栓はタンパク質フィブリンおよび血球を含有するが、存在する特定の血球およびフィブリン/血球の比率は、例えば、血栓形成部位における血流および血栓の年齢のために、異なることがある。高速血流部位に形成する動脈血栓は、細いフィブリン網により一緒に結合した血小板凝集物を含有する。静脈血栓はほとんどいかなる血流領域においても形成し、散在するフィブリンおよび少量の血小板を含む赤血球を含有する。遅い〜中程度の流れの条件下に形成する血栓は、赤血球、血小板、およびフィブリンの混合物を含有する。白血球、すなわち、白色血球は、それらが老化するとき、血栓に移動し、血栓の中に絡込まれるよう

になる。さらに、老化する血栓中の凝集した血小板は溶解し、フィブリンと置換される。

【0003】

治療を選択し、最適化し、そしてモニターするために、種々の種類の血栓の正確な検出を必要とする。治療は血栓の位置および特質により異なることがある。最近、ACUTECTTM、すなわち、^{99m}Tc放射能標識化ペプチド、アプシチド (apciti de) を作るキットは、米国において、急性深静脈血栓症 (DVT) を造影する放射性薬学的製品として販売が承認された。ACUTECTTM の商業的に入手可能性は、急性DVTの検出の精度を有意に改良し、結局、このような血栓の治療を改善する。しかしながら、他の種類の血栓の検出のために放射性薬学的製品は承認されてきていず、そして他の種類の血栓、例えば、肺の血栓および動脈血栓の検出に利用可能な大部分正確な方法は侵入性である。種々の種類の血栓を検出することができ、る追加の非侵入性因子が必要とされている。

【0004】

^{99m}Tc放射能標識化アプシチドは、血小板の表面上の最も豊富な糖タンパク質であるGPIIb/IIIaレセプターに結合する。GPIIb/IIIaレセプターは血小板凝集物に要求され、そして血栓形成の決定的な成分であり、接着性タンパク質フィブリノゲン (フィブリンの前駆体)、フィブロンネクチン、フォン・ウィルブラント因子、およびヴィトロネクチンのためにレセプターとして機能する。GPIIb/IIIaとその天然リガンドとの間の相互作用は、トリペプチドアルギニン-グリシン-アスパラギン酸 (RGD) により伝達される。アプシチドは、GPIIb/IIIaと相互作用すると考えられるトリペプチド、すなわち、L- [S- (3-アミノプロピル) システイン] - グリシン-アスパラギン酸を含有する。

【0005】

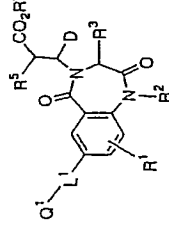
米国特許第5,645,815号には、高い品質の血栓造影剤が約0.3μMより低いIC₅₀で血小板凝集を阻害することができる、GPIIb/IIIaレセプター-結合性化合物を含有することが開示されている。米国特許第5,830,856号には、このような造影剤が約0.1μMより低いIC₅₀で血小板凝集を阻害することができる、GPIIb/IIIaレセプター-結合性化合物を含有することが開示されている。

【0006】

米国特許第5,403,836号、第5,493,020号、第5,565,449号、第5,663,166号、第5,674,863号、第5,674,865号、第5,705,890号、および第5,716,951号に開示されている、GPIIb/IIIa結合性血小板凝集インヒビターの1つのクラスは置換ベンゾジアゼピンジオンである。ベンゾジアゼピンジونسカホールドは、血小板凝集阻害活性と相関する、RGDトリペプチドの「カップド (cupped)」立体配置に近似的する。米国特許第5,403,836号、第5,493,020号、第5,565,449号、第5,663,166号、第5,674,863号、第5,674,865号、第5,705,890号、および第5,716,951号には、下記一般式の誘導体を包含する、ベンゾジアゼピンジオン誘導体のいくつかの大きいクラスが記載されている：

【0007】

【化8】



【0008】

式中R¹、R²、およびR³は各々独立してHまたは反応性基であり、R⁴およびR⁵は各々独立してH、アルキル、置換アルキル、アリール、置換アリール、またはそれらの組合わせであり、R⁶は水素、フェニル、または低級アルキルであり、Lは結合部分であり、そしてQは正に帯電した窒素含有部分である。米国特許第5,403,836号、第5,493,020号、第5,565,449号、第5,663,166号、第5,674,863号、第5,705,890号、第5,716,951号の置換ベンゾジアゼピンジオンはもっぱら治療剤として記載されている。

【0009】

Ku他 (1993) J. Am. Chem. Soc. 115, 8861-8862は、糖タンパク質11b/11laレセプター-仲介血小板凝集のインヒビターとして、ベンゾジアゼピン誘導の配剤および合成を記載している。Ku他1, 4-ベンゾジアゼピン誘導は、もっぱら潜在的抗血栓剤として記載されている。

【0010】

米国特許第4,656,026号には、脳組織の磁気共鳴造影のためのスピニ標識化ベンゾジアゼピンが記載されている。米国特許第4,477,169号には、体液中のベンゾジアゼピンレベルを測定するためにラジオイムノアッセイにおいて使用される放射能ヨウ素化ベンゾジアゼピンが開示されている。J.S.P.No. 4,885,152号には、脳組織中のベンゾジアゼピンレセプターを検出するための放射能ヨウ素化および放射能臭素化ベンゾジアゼピン誘導体が記載されている。米国特許第4,997,771号には、ベンゾジアゼピン誘導体レセプター結合活性をアッセイするために使用される11-ベンゾジアゼピンが開示されている。米国特許第5,096,695号には、造影剤として使用するための放射能ヨウ素化ベンゾジアゼピン誘導体が開示されている。W0 95/12610号には、鉛体化性レニウムまたはテクネチウムイオンにおいて使用するための、ベンゾジアゼピンを包含する、種々のリガンドに共有結合することができるN-アルキルペプチドキレート化剤が開示されている。JP 5-310711号には、てんかん、パーキンソン症候群および脳浮腫を診断する脳神経中のベンゾジアゼピンレセプターの電子スピン共鳴造影のためのN-置換ベンゾジアゼピン-2-オン誘導体が開示されている。

発明の要約

本発明者らは、ベンゾジアゼピン誘導体を有効な血栓造影剤として使用できることを発見した。

【0011】

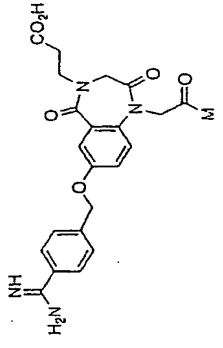
1つの態様において、本発明は、金属イオンキレート化剤に共有結合された糖タンパク質11b/11laレセプター結合性ベンゾジアゼピン誘導体を含んで成り、血小板凝集阻害剤としての標準アッセイにおいて測定したとき、ヒト血小板凝集を阻害する実質的な効力を保持する化合物を提供する。

【0012】

他の態様において、下記式を有する化合物を提供する：

【0013】

【化9】



【0014】

式Iは金属イオンキレート化剤である。

【0015】

他の態様において、本発明は、 γ 放射放射性核種と、本発明の化合物とを含んで成るシンチグラフィック造影剤を提供する。

【0016】

他の態様において、本発明は、 γ 放射放射性核種と、本発明の化合物とを含んで成る鉛体を提供する。

【0017】

なお他の態様において、本発明は、化合物が ^{99m}Tc に対してキレート化したとき、血小板凝集阻害剤としての標準アッセイにおいて測定して、ヒト血小板凝集を阻害する実質的な効力を保持し、かつキレート化剤が ^{99m}Tc に結合した少なくとも1つの硫黄を含有する、金属イオンキレート化成分に共有結合された糖タンパク質11b/11laレセプター結合性ベンゾジアゼピンを含んで成る化合物の ^{99m}Tc キレート化剤を提供する。

【0018】

他の態様において、本発明は、有効診断用の本発明のシンチグラフィック造影

剤または錯体を哺乳動物の体に投与し、そして血検に局在化された放射能を検出する工程を含む方法を提供する。

発明の詳細な説明

本明細書において参照する特許および科学文献は、当業者にとって入手可能な知識を確立する。

【0019】

本発明の化合物は、糖タンパク質[1b/11a]レセプター結合性ベンゾジアゼピン成分と、金属イオンキレート化成分と含んで成る。本発明によれば、用語「ベンゾジアゼピン誘導体」または「ベンゾジアゼピン成分」は互換的であり、そしてベンゾジアゼピン核、すなわち、芳香族6メンバー環に融合された7メンバー環を含んで成る任意の分子を包含するとして定義される。血小板凝集阻害の標準アッセイ、例えば、Zucker, Methods in Enzymology (1989) 169: 117-133に記載されているアッセイにおいてヒト血小板凝集について阻害濃度50% (IC_{50}) の化合物により測定したとき、化合物が実質的な効力を保持するかぎり、本発明の化合物は任意のベンゾジアゼピン成分を含んで成ることができる。本発明において定義するとき、「実質的な効力」は、好ましくは、約 $1\mu M$ より低いヒト血小板凝集の阻害についての IC_{50} 、より好ましくは約 $0.3\mu M$ より低いヒト血小板凝集の阻害についての IC_{50} 、最も好ましくは約 $0.1\mu M$ より低いヒト血小板凝集の阻害についての IC_{50} として定義される。

【0020】

好ましくは、ベンゾジアゼピンの血小板凝集阻害活性に実質的に影響を与えないで金属イオンキレート化剤の共有結合のために、置換ベンゾジアゼピンをさらに誘導化することができるかぎり、 Ku 他、前項に開示されている置換1, 4-ベンゾジアゼピン誘導体は本発明の化合物のベンゾジアゼピン成分として使用される。同様に、ベンゾジアゼピンの血小板凝集阻害活性に実質的に影響を与えないで金属イオンキレート化剤の共有結合のために、置換ベンゾジアゼピンジオンをさらに誘導化することができるかぎり、米国特許第5, 403, 836号、第5, 493, 020号、第5, 565, 449号、第5, 663, 166号、第5, 674, 963号、第5, 674, 965号、第5, 705, 890号、および第5, 716, 951に開示されている任意の置換ベンゾジアゼピンジオンは

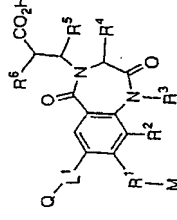
本発明の化合物のベンゾジアゼピン成分として使用される。より好ましくは、米国特許第5, 663, 166号に開示されかつ特許請求されている置換1, 4-ベンゾジアゼピン-2, 5-ジオンは、本発明の化合物中の糖タンパク質[1b/11a]結合性成分として使用される。最も好ましくは、後に記載する式に対応する置換1, 4-ベンゾジアゼピン-2, 5-ジオンは、本発明の化合物中の糖タンパク質[1b/11a]結合性成分として使用される。

【0021】

1つの態様において、本発明は、下記式を有する化合物を提供する：

【0022】

【化10】



【0023】

式中R¹はC₁-C₆低級アルキルであり、R²、R³、R⁴、R⁵、およびR⁶は各自独立してH、C₁-C₆低級アルキル、置換C₁-C₆アルキル、アリール、置換アリール、またはそれらの組合わせであり、L'は結合部分であり、Qは正に帯電した窒素含有部分であり、そしてMは金属イオンキレート化剤である。

【0024】

本発明において定義するとき、「置換C₁-C₆アルキル」は、ヒドロキシル基、エーテル、チオエーテル、C₁-C₆分枝鎖状炭化水素、C₁-C₆直鎖状炭化水素、アミン、第一級アルキルアミン、第二級アルキルアミン、第一級アリールアミン、第二級アリールアミン、第一級アルキルシリケート、第二級アルキルシリケート、第三級アルキルシリケート、およびその他で置換された表示した長さのアルキ

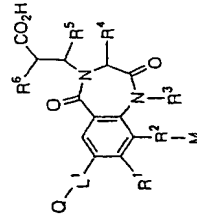
ルを意味する。本発明によれば、「アリール」は飽和もしくは不飽和であることができ、必要に応じて複素環式であることができる。本発明の「置換アリール」は、必要に応じて複素環式であることができかつまたはそれ以上の位置においてヒドロキシ基、エーテル、チオエーテル、 C_1-C_6 分枝鎖状炭化水素、 C_1-C_6 直鎖状炭化水素、アミン、第一級アルキルアミン、第二級アルキルアミン、第一級アリールアミン、第二級アリールアミン、ニトロ基、ハロゲン、スルホン酸、アルキルスルホニル、スルホンアミド、およびその他で置換されたアリールを意味する。

【0025】

他の態様において、本発明は、下記式を有する化合物を提供する：

【0026】

【化11】



【0027】

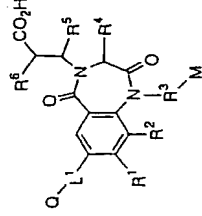
式中 R' は C_1-C_6 低級アルキルであり、 R'' 、 R''' 、 R'''' 、および R''''' は各々独立してH、 C_1-C_6 低級アルキル、置換 C_1-C_6 アルキル、アリール、置換アリール、またはそれらの組合わせであり、 L' は結合部分であり、Qは正に帯電した窒素含有部分であり、そしてMは金属イオンキレート化剤である。

【0028】

他の態様において、本発明は、下記式を有する化合物を提供する：

【0029】

【化12】



【0030】

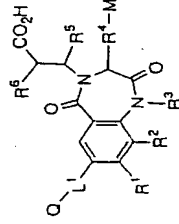
式中 R' は C_1-C_6 低級アルキルであり、 R'' 、 R''' 、 R'''' 、および R''''' は各々独立してH、 C_1-C_6 低級アルキル、置換 C_1-C_6 アルキル、アリール、置換アリール、またはそれらの組合わせであり、 L' は結合部分であり、Qは正に帯電した窒素含有部分であり、そしてMは金属イオンキレート化剤である。

【0031】

他の態様において、本発明は、下記式を有する化合物を提供する：

【0032】

【化13】



【0033】

式中 R' は C_1-C_6 低級アルキルであり、 R'' 、 R''' 、 R'''' 、および R''''' は各々独立し

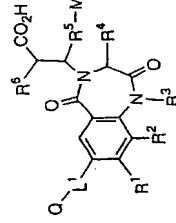
てH、C₁ - C₆ 低級アルキル、置換C₁ - C₆ アルキル、アリール、置換アリール、またはそれらの組合わせであり、L¹ は結合部分であり、Qは正に帯電した窒素含有部分であり、そしてMは金属イオンキレート化剤である。

【0034】

他の態様において、本発明は、下記式を有する化合物を提供する：

【0035】

【化14】



【0036】

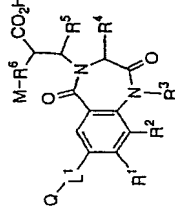
式中R⁶ はC₁ - C₆ 低級アルキルであり、R¹、R²、R³、R⁴、およびR⁵ は各々独立してH、C₁ - C₆ 低級アルキル、置換C₁ - C₆ アルキル、アリール、置換アリール、またはそれらの組合わせであり、L¹ は結合部分であり、Qは正に帯電した窒素含有部分であり、そしてMは金属イオンキレート化剤である。

【0037】

他の態様において、本発明は、下記式を有する化合物を提供する：

【0038】

【化15】



【0039】

式中R⁶ はC₁ - C₆ 低級アルキルであり、R¹、R²、R³、R⁴、およびR⁵ は各々独立してH、C₁ - C₆ 低級アルキル、置換C₁ - C₆ アルキル、アリール、置換アリール、またはそれらの組合わせであり、L¹ は結合部分であり、Qは正に帯電した窒素含有部分であり、そしてMは金属イオンキレート化剤である。

【0040】

上記式の各々において、結合部分L¹ は約3〜約9つのメチレン基を含有する2価の基であるか、あるいはL¹ は約3〜約9つのメチレン基に等しい長さを有する2価の基である。好ましくは、L¹ は約4〜約6つのメチレン基に等しい長さを有する。より好ましくは、L¹ は約5つのメチレン基に等しい長さを有する。L¹ は好ましくは1またはそれ以上のsp² またはsp原子を含有し、こうして拘束される。本発明によれば、L¹ は1またはそれ以上のアルケン、アルキン、アリール、複素環式、またはN、OまたはSを含有する1またはそれ以上の官能基を含有することができる。好ましくは、L¹ はケトン、スルホキシド、第二級アミン、アミド、ウレイド、カルバメート、スルホンアミド、またはスルホンを含んで成る。より好ましくは、L¹ はチオエーテルを含んで成る。より好ましくは、L¹ はエーテル、特にアルキルエーテル、例えば、メチルエーテルを含んで成る。

【0041】

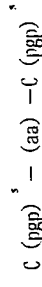
正に帯電した部分Qは1またはそれ以上の窒素原子を含有し、そして前記原子が生理学的pHにおいて少なくとも10%正に帯電しているために十分なpKaを有する。本発明によれば、Qは単離されているか、あるいは他の窒素原子と接合してい

【0044】

本発明の化合物は、任意の金属イオンキレート化剤を含んで成ることができる。金属イオンキレート化剤の存在が難タンパク質IIb/IIlaレセプターに結合する化合物の能力を実質的に妨害しないかぎり、金属イオンキレート化剤をベンゾジアゼピンスカホルドの任意の位置において置換ベンゾジアゼピンに結合させることができる。「実質的に妨害する」とは、上に定義したように、化合物がヒト血小板凝集を阻害する効力を多少有することを意味する。

【0045】

例えば、本発明の化合物は下記式を行す金属イオンキレート化剤を含んで成ることができる：



式中 (pgp)^s は水素またはチオール保護基であり、そして (aa) はチオール基を含まない α -または β -アミノ酸である。好ましい態様において、アミノ酸はグリシンである。このような金属イオンキレート化剤を製造する方法は、米国特許第5,654,272号、米国特許第5,681,541号、米国特許第5,788,960号、および米国特許第5,811,394号に記載されている。

【0046】

あるいは、本発明の化合物は、下記の特許に記載されているように、金属イオンと電子的に中性の錯体を形成することができる金属イオンキレート化剤を含んで成ることができる：米国特許第5,720,934号、米国特許第5,776,428号、および米国特許第5,780,007号、許可されたUSN 08/467,791、USN 08/468,964およびUSN 08/170,299、およびUSN 07/871,282。このようなキレート化剤は下記のものを含むが、これらに限定されない：

【0047】

【化16】

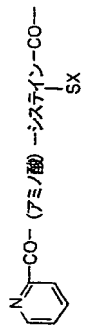
る1またはそれ以上の第一級、第二級、第三級、または第四級アミノまたはイミンを含んで成ることができる。あるいは、Qは飽和もしくは不飽和の（芳香族を含む）複素環式基であることができ、ただし前記基は生理学的ににおいて正電荷を有する。

【0042】

本発明によれば、Qは下記のような基から選択されるが、これらに限定されない：アミノ、イミノ、アミジノ、アミノメチレンイミノ、アミノメチレンアミノ、イミノメチルアミノ、グアジニノ、N'-アミノグアジニノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアミノ、アルキリデンアミノ、ピラニル、ピロリル、イミダゾリル、ピラゾリル、ピリジル、ピラジニル、ピリミジニル、ピリダジニル、インドリジニル、イソインドリル、3H-インドリル、インドリル、IH-インダゾリル、プリニル、4H-キノリジニル、イソキノリル、キノリル、フタラジニル、ナフチリジニル、キノキサリニル、キサゾリニル、シンノリニル、テリジニル、4aH-カルバゾリル、カルバゾリル、b-カルボリニル、フェナントリジニル、アクリジニル、フェナントロニル、フェナジニル、フェナルサルジニル、フェノチアジニル、ピロリニル、イミダゾリジニル、イミダゾリニル、ピラゾリジニル、ピラゾリニル、ピペリジニル、ピペラジニル、インドリニル、イソインドリニル、キヌクリジニル、モルホリニル、1,3-ジアザシクロヘキシー-4-エノン、およびそれらの組合わせ。必要に応じて、任意の前記の複素含有複素環は、アミノ、イミノ、アミジノ、アミノメチレンアミノ、イミノメチルアミノ、グアジニノ、N'-アミノグアジニノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアミノ、またはアルキリデンアミノ基で置換されることができる。好ましくは、Qはアミジノまたは置換アミジノ基である。

【0043】

置換難タンパク質IIb/IIlaレセプター結合性ベンゾジアゼピンジオンを製造する方法は、米国特許第5,403,836号、第5,493,020号、第5,565,449号、第5,663,166号、第5,674,863号、第5,674,865号、第5,705,890号、および第5,716,951号および下記の実施例に開示されている。置換難タンパク質IIb/IIlaレセプター結合性ベンゾジアゼピンを製造する方法は、Ku他、前掲に開示されている。

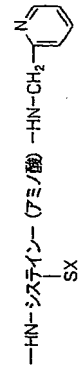


【0048】

式中XはHまたは保護基であり、そして（アミノ酸）は任意のアミノ酸である：

【0049】

【化17】

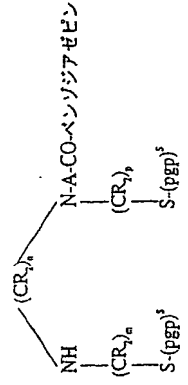


【0050】

式中XはHまたは保護基であり、そして（アミノ酸）は任意のアミノ酸である：

【0051】

【化18】



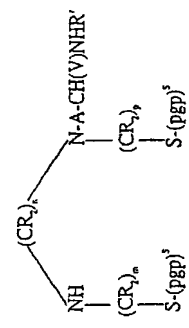
【0052】

式中各Rは独立してH、Cl、またはC₁H₅であることができ、各（pgp）^sは独立し

てチオール保護基またはHであることができ、m、nおよびpは独立して2または3である。Aは直鎖状C₁-C₆アルキル、置換直鎖状C₁-C₆アルキル、環状C₆-C₁₀アルキル、置換環状C₆-C₁₀アルキル、アリール、置換アリール、またはそれらの組合わせであり、そしてXはベンゾジアゼピンである；および

【0053】

【化19】



【0054】

式中各Rは独立してH、Cl、またはC₁H₅であることができ、m、nおよびpは独立して2または3であり、Aは直鎖状C₁-C₆アルキル、置換直鎖状C₁-C₆アルキル、環状C₆-C₁₀アルキル、置換環状C₆-C₁₀アルキル、アリール、置換アリール、またはそれらの組合わせであり、VはHまたはC₁-C₆ベンゾジアゼピンであり、R'はHまたはベンゾジアゼピンであり、ただしVがHであるとき、R'はベンゾジアゼピンであり、そしてR'がHであるとき、VはC₁-C₆ベンゾジアゼピンである。本発明によれば、ビスアミド、ビスチオールの式中の置換誘導体は上に定義した通りである。

【0055】

あるいは、本発明の化合物は、下記のものから成る群から選択される式を有する金属イオンキレート化剤を含んで成ることができる：

ジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）；

下記式を有するDTPAの誘導体：



式中各Rは独立してH、Cl、またはC₁アルキル、またはアリールであり、そして1つのR

は2価のリンカーに共有結合している；

エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) ；

下記式を有するEDTAの誘導体；



式中各Rは独立してH、C₁-C₄アルキル、またはアリールであり、そして1つのR

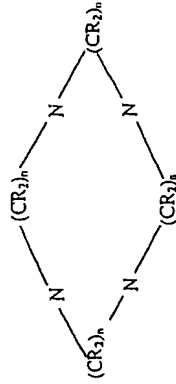
は2価のリンカーに共有結合している；

1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン四酢酸およびその誘導体；

下記式を有する金属イオンキレート化剤；

【0056】

【化20】



【0057】

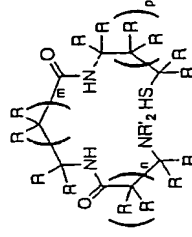
式中mは2または3である整数であり、そして各Rは独立してH、C₁-C₄アルキル、またはアリールであり、そして1つのRは2価のベンゾジアゼピン誘導体に共有結合している。

【0058】

より好ましくは、本発明の化合物はモノアミン、ジアミド、単一のチオールを含有する金属イオンキレート化剤、例えば、普通に譲渡された同時継続USN 08/253,973号に記載されているキレート化剤を含んで成る。このような金属イオンキレート化剤の例は下記式を有するキレート化剤である；

【0059】

【化21】

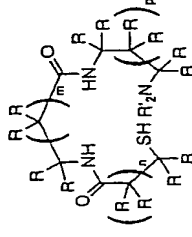


【0060】

および

【0061】

【化22】



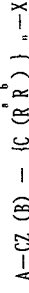
【0062】

式(11)、mおよびpの各々は独立して0または1である整数であり、各R'は独立してH、低級アルキル、C₁-C₄ヒドロキシアルキル、またはC₁-C₄アルコキシアルキルであり、そして各Rは独立してHまたはR''であり、ここでR''はチオール基を有しない置換C₁-C₄アルキル、非置換C₁-C₄アルキル、非置換フェニル、またはチオール基を有しないフェニルであり、そして1つのRまたはR'はシであり、シは金属キレート化剤を新タンパク質11b/11aレセプター結合性ベンゾジアゼピンに結合させる2価のリンカー部分であり、ここで1つのR'はシであり、NR'はアミンである。この態様において、シはC₁-C₄直鎖状アルキル基、分枝鎖状アルキル

ル基、環状アルキル基、カルボン酸エステル、カルボキシアミド、スルホンアミド、エーテル、チオエーテル、アミン、アルケン、アルキン、1, 2-結合、置換されているもよい、ベンゼン環、1, 3-結合、置換されているもよい、ベンゼン環、1, 4-結合、置換されているもよい、ベンゼン環、またはそれらの組合わせであることができる。この態様において、R'はC₁-C₆直鎖状アルキル；分枝鎖状アルキル基；環状アルキル基；-C₆OC₁-、-C₆NHC₁-または-C₆SC₁-基、ここでqおよびrは各々独立して1~5の整数であり、ここでq+rの合計は6以下である；(C₁-C₆)アルキル-X、ここでXはヒドロキシル基、置換アミン、グアニジン、アミジン、置換チオール基、またはカルボン酸、エステル、ホスフェート、またはサルフェート基である；フェニル基またはハロゲン、ヒドロキシル基、置換アミン、グアニジン基、アミジン基、置換チオール、エーテル、ホスフェート、サルフェート基で置換されたフェニル基；インドール基；1~3個の窒素、酸素または硫黄原子を含有するC₁-C₆複素環式基、またはそれらの組合わせであることができる。本発明によれば、モノアミン、ジアミド、チオール含有キレート化剤の式における置換誘導体は上に定義した通りである。

【0063】

より好ましくは、本発明の化合物は下記式の単一のチオールを含有する基を含んで成る金属イオンキレート化剤を含んで成る：



式中AはH、HOOC-、H₂NOC-、-NHC(=O)-、R'-NOC-またはR'であり、BはH、SH、-NHR'、-N(R')-またはR'であり、ZはHまたはR'であり、XはSH、-NHR'、-N(R')-またはR'であり、R'、R'、R'およびR'は独立してH、直鎖状C₁-C₆アルキル、分枝鎖状C₁-C₆アルキル、または環状C₁-C₆アルキルであり、nは0、1または2であり、R'はC₁-C₆アルキル、アミノ酸、または2~約10アミノ酸を含んで成るペプチドであり、そして(1) Bが-NHR'または-N(R')-である場合、XはSHでありかつnは1または2であり、(2) Xが-NHR'または-N(R')-である場合、AはHOOC-、H₂NOC-、-NHC(=O)-または-NOC-であり、XはSHでありかつnは0または1であり、(4) AがHまたはR'である場合、BがSHであるとき、Xは-NHR'

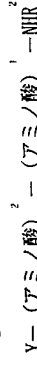
または-N(R')-でありかつXがSHであるとき、Bは-NHR'または-N(R')-でありかつnは1または2であり、(5) XがHまたはR'である場合、AはHOC(=O)-、H₂NOC(=O)-、-NHC(=O)-または-NOC(=O)-でありかつBはSHであり、(6) Zがメチルである場合、Xはメチルであり、AはHOC(=O)-、H₂NOC(=O)-、-NHC(=O)-または-NOC(=O)-でありかつnは0であり、そして(7) BがSHである場合、XはSHではなくそしてXがSHであるとき、BはSHではない。

【0064】

本発明によれば、単一のチオールを含有する基を含んで成る金属イオンキレート化剤は下記式を有することができる：



式中(Aminoacid)および(Aminoacid)は各々独立してチオール基を含まない任意の第一級α-またはβ-アミノ酸であり、Zはシステイン、ホモシステイン、インソシステイン、ペニシルアミン、2-メルカプトエチルアミン、2-メルカプトプロピルアミン、2-メルカプト-2-メルチルプロピルアミン、および3-メルカプトプロピルアミンから成る群から選択され、そしてRは低級(C₁-C₄)アルキルであるか、あるいはR-COはアミノ酸、ペプチド、または(aa)ペプチドであり、ここでZはシステイン、ホモシステイン、インソシステインまたはペニシルアミンであるとき、Zはヒドロキシル基、NR'基(ここでR'およびR'の各々は独立してH、結合、低級(C₁-C₄)アルキルである)、アミノ酸または2~10アミノ酸を含んで成るペプチドに共有結合したカルボニル基である；およびあるいは、単一のチオールを含有する基を含んで成る金属イオンキレート化剤は下記式を有することができる：



式中(Aminoacid)および(Aminoacid)は各々独立してチオール基を含まない任意の第一級α-またはβ-アミノ酸であり、Yはシステイン、ホモシステイン、インソシステイン、ペニシルアミン、2-メルカプトアセテート、2-メルカプトプロピオネート、2-メルカプト-2-メルチルプロピオネート、および3-メルカプトプロピオネートから成る群から選択され、そしてR'はH、結合、低級(C₁-C₄)アルキルであり、そしてNHR'はアミノ酸、ペプチド、または(aa)ペプチド

--ly--Cly--Cys-- 、 $\text{--}(\delta\text{--}0\text{rn})\text{--Cly--Cys--}$ 、 $\text{--}(\gamma\text{--Dab})\text{--Cly--Cys--}$ 、および $\text{--}(\beta\text{--Dap})\text{--lys--Cys--}$ およびその他。(これらの式において、理解されるように、 $\epsilon\text{--lys}$ は典型的な $\alpha\text{--アミノ基}$ よりむしろ $\epsilon\text{--アミノ基}$ が隣接する $\alpha\text{--アミノ酸}$ のカルボキシル基に共有結合してペプチド結合を形成している、リシン残基を表す； $\delta\text{--}0\text{rn}$ は典型的な $\alpha\text{--アミノ基}$ よりむしろ $\delta\text{--アミノ基}$ が隣接する $\alpha\text{--アミノ酸}$ のカルボキシル基に共有結合してペプチド結合を形成している、オルニチン残基を表す； $\gamma\text{--Dab}$ は $\gamma\text{--アミノ基}$ が隣接する $\alpha\text{--アミノ酸}$ のカルボキシル基に共有結合してペプチド結合を形成している、2, 4-ジアミノ酪酸残基を表す；そして $\beta\text{--Dap}$ は $\beta\text{--アミノ基}$ が隣接する $\alpha\text{--アミノ酸}$ のカルボキシル基に共有結合してペプチド結合を形成している、1, 3-ジアミノプロピオン酸残基を表す。 $\alpha\text{--アミノ酸}$ の他の略号は慣用のものである。表示「Cysアミド」は残基システインのアミド化された形態を表す。)

最も好ましい態様の金属イオンキレート化剤を製造する方法は、米国特許第5, 443, 815号、第5, 807, 537号、第5, 814, 297号、および第5, 866, 097号、およびUSN 08/236, 402号、08/253, 678号、08/253, 973号、および08/582, 134号。

【0069】

当業者は認識するように、大部分の金属イオンは前述の金属イオンキレート化剤にキレート化することができる。シグナル標識を発生することができる任意の金属イオンを本発明のベンゾジアゼピン誘導体化合物にキレート化し、こうして本発明の化合物の金属イオン錯体を形成することができる。適当な金属イオンは、コンピュータ化技術において使用するために適当な放射性金属イオン、蛍光性金属イオン、常磁性金属イオン、重金属イオン、希土類イオン、およびその他を包含する。放射性金属イオンおよび放射性核種は好ましい。より好ましくは、 γ 放射放射性核種、例えば、 ^{67}Cu 、 ^{68}Ga 、 ^{111}In 、および ^{203}Tl は本発明の方法において使用される。最も好ましくは、 ^{203}Tl と本発明の化合物との間で形成された錯体を血拴の造影に使用される。

【0070】

金属イオンキレート化剤は金属イオンと会合してキレートを形成し、そしてキレート化剤の原子は「配位子」として普通に知られている。キレート化技術にお

いて、配位子はキレート配位結合を形成する。本発明によれば、金属イオンが ^{203}Tl であるとき、キレートは「 $^{203}\text{Tl--キレート}$ 」と命名される。 ^{203}Tl は親チオ性金属であり、こうして本発明の $^{203}\text{Tl--キレート}$ は好ましくは ^{203}Tl に対する配位共有結合を介して少なくとも1つの硫黄配位子結合を含有する。

【0071】

本発明の錯体およびキレートは既知の方法に従い形成することができる。例えば、還元剤、例えば、ジチオナイトイオン、第一スズイオンまたは第一鉄イオンの存在下に ^{203}Tl ペルテクネートを化合物と反応させることができる。この方法において、最も好ましい還元剤は塩化第一スズである。あるいは、錯体およびキレートは配位子交換により形成することができる。ここで ^{203}Tl と転移配位子として普通に知られている他の化合物との前もって形成した不安定な錯体と本発明の化合物を反応させる。このプロセスにおいて、任意の転移配位子、例えば、酒石酸塩、クエン酸塩、グルコネート、グルコヘブトネート、またはマンニトールを使用することができる。

【0072】

本発明の化合物を使用して製造された血拴造影剤は、好ましくは医薬組成物として、生きている哺乳動物に静脈内投与される。本発明の化合物は無菌の、無発熱物質の、非経口的許容される水溶液として処方され、この溶液は必要に応じて凍結乾燥された形態で供給され、ユーザーにより再構成されることができる。

【0073】

本発明の医薬組成物は、本発明の化合物を薬学上許容される希釈剤または担体、例えば、種に適切なアルブミンと組合わせて含んでなる。本明細書において使用するとき、「薬学上許容される希釈剤または担体」は、任意の、すべての溶媒、分散媒質、抗菌および抗真菌剤、等張剤、酵素インヒビター、安定剤、およびその他を包含することができる。薬学的に活性な物質のためにこのような媒質および薬剤を使用することはこの分野においてよく知られている。例えば、塩化ナトリウム注射およびリンガン注射は希釈剤として普通に使用されている。pH、等張性、安定性、およびその他のに関して、このような非経口的に許容される溶液の調整は当業者の技量の範囲内である。

【0074】

本発明の化合物および組成物は、キットの成分として提供することができる。このキットは緩衝剤、追加のバイアル、使用説明書、およびその他を含むことができる。本発明のキットは、前もって決定した量の化合物、および必要に応じて、金属イオンがテクネチウム-99mであるとき、還元剤を含有する、密閉されたバイアルを含有して成る。適当量の転移配位子、例えば、酒石酸塩、クエン酸塩、グルコネート、グルコヘプトレートまたはマンニトールをキットに含めることもできる。キットの成分は液体、凍結または乾燥した形態であることができる。好ましくは、キットの成分は凍結乾燥された形態で提供される。

【0075】

本発明によれば、本発明のベンゾジアゼピン誘導体化合物を含んでなる医薬組成物から製造した造影剤は、単一単位投与形態で静脈内に、完全にボラスとしてまたは部分的にボラスとして投与し、次いで1〜2時間にわたって注入する。単位投与で注射すべき溶液の量は約0.01ml〜約10mlであり、約0.01mCi〜約100mCiの放射能、好ましくは約1mCi〜約20mCiの放射能を含有する。単位投与量中の化合物の気圧は約0.1ml〜約10mg/kg体重の範囲であることができる。静脈内投与後、例えば、in vivoにおける放射能造影により、血栓部位をモニターする。

【0076】

下記の実施例により、本発明を例示する。これらの実施例は本発明を限定しない。

実施例1

1- [(カルボキシグリシル-グリシル-グリシル-グリシル-システインアミド) メチル] -4- (2-カルボキシエチル) -7- [(4-アミノジフェニル) メチル] -3, 4-ジヒドロ-1H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2, 5-ジオンの合成

典型的なベンゾジアゼピン造影剤の合成を後述する。

A. N-Boc-5-ヒドロキシアントラニル酸 [1]

磁気攪拌機を装備した5リットルの3首丸底フラスコの中に、5-ヒドロキシアントラニル酸 (100g, 0.65mol) を入れる。飽和炭酸ナトリウム溶液 (1.5リットル) を攪拌しながら反応フラスコに添加した。二酸化炭素の発生がおさまった後

、1.5リットルのテトラヒドロフラン (THF) 中のジ-tert-ブチルジカルボネート (156.8g, 0.72mol) を反応器に添加し、生ずる2相混合物を完全に混合するため反応器を攪拌した。反応混合物を室温において24時間攪拌し、この時間において1.0リットルのエチルエーテルを添加し、混合物を分液漏斗に移した。水性層をさらに1.0リットルのエチルエーテルで抽出し、2MのH₂PO₄でpH=3.0にした。生成物を水溶液から酢酸エチル (3×10リットル) で抽出した。一緒にした有機相を飽和NaCl溶液で洗浄し、Na₂SO₄上で乾燥し、濾過し、真空濃縮すると、N-Boc-5-ヒドロキシアントラニル酸 (153g, 92.5%の収率) が得られた。

B. N-Boc-5-ベンジルオキシアントラニル酸、ベンジルエステル [2]

乾燥した5リットルの3首丸底フラスコにアルゴン雰囲気下に、水素化ナトリウム (95%, 36.2g, 1.51mol) を入れた。無水ジメチルホルムアミド (DMF) をカニューレで添加し、次いで注意してN-Boc-5-ヒドロキシアントラニル酸 (150g, 0.59mol) を添加した。反応混合物を氷/水浴で冷却し、反応温度を50℃以下に保持しながら、臭化ベンジル (148ml, 1.24mol) を注射器で添加した。添加が完了した後、反応混合物を45℃〜50℃において6時間攪拌した。この時において、追加の臭化ベンジルを添加し、反応を45℃〜50℃においてさらに2時間続けた。酢酸 (20ml) を注意して添加し、反応混合物を丸底フラスコに移し、ほぼ400mlの体積に濃縮した。酢酸エチル (1.0リットル) を添加し、生ずる溶液を存在する固体からデカンントした。フラスコを追加の酢酸エチル (2×50ml) でリンスし、各リンス後にデカンントした。一緒にした有機相を水 (1.0リットル) および飽和NaCl (500ml) で洗浄した。有機相を濾過し、真空濃縮すると、N-Boc-5-ベンジルオキシアントラニル酸、ベンジルエステルが赤味がかった褐色シロップ状物として得られた。粗生成物を沸騰するヘキサン (3リットル) に移し、さらに10分間還流させた。溶液をまだ熱い間に濾過し、48時間放冷すると、72gの生成物が得られた (28%の収率)。

C. 5-ベンジルオキシアントラニル酸、ベンジルエステル、塩酸塩 [3]

N-Boc-5-ベンジルオキシアントラニル酸、ベンジルエステル (70g, 161mmol) を、1.4MのHCl/酢酸エチル溶液 (メタノールを塩化アセチルに添加し、次いで酢酸エチルで希釈することによって調製した) に添加した。反応混合物室温に

において21時間攪拌した。0℃に冷却した後、反応混合物をさらに2時間おだやかに攪拌した。結晶質生成物を濾過し、50mlの酢酸エチルで洗浄した。微量の溶媒を高真空下に除去すると、5-ベンジルオキシアントラニル酸、ベンジルエステル、塩酸塩が得られた (53.4g、86%の収率)。

- D. N- (カルボートブトキシメチル) -5-ベンジルオキシアントラニル酸、ベンジルエステル [4]
- 飽和重碳酸ナトリウム溶液 (1.0リットル) を、4リットルのエルレンマイヤーフラスコに1.0リットルの酢酸エチルと一緒に入れた。混合物を攪拌する速度で2相混合物を攪拌し、5-ベンジルオキシアントラニル酸、ベンジルエステル、塩酸塩が得られた (50.0g、135mmol) を攪拌した混合物に少しずつ添加した。添加が完了した後、混合物をさらに15分間攪拌した。分液漏斗中で層を分離し、水性層を酢酸エチル (500ml) で抽出した。一緒にした有機相をMgSO₄上で乾燥し、濾過し、真空濃縮すると、遊離塩基が得られ、これをアルゴン雰囲気下に無水DMF (700ml) 中に溶解した。2, 6-ルチジン (20.0ml、172mmol) を溶液に添加し、次いでt-ブチルプロモセテート (29.0ml、196mmol) を添加した。反応混合物をアルゴン雰囲気下に70℃において48時間攪拌した。DMFを高真空下に回転蒸発器上で除去し、粗生成物残留物を酢酸エチル (1.0リットル) と水 (500ml) との間に分配した。有機層を飽和NaCl (250ml) で洗浄し、Na₂SO₄上で乾燥した。この溶液を濾過し、真空濃縮すると、粗生成物が暗褐色固体として得られた。生成物を7%酢酸エチル/ヘキサンから再結晶化させると、N- (カルボートブトキシメチル) -5-ベンジルオキシアントラニル酸、ベンジルエステルが得られた (46.4g、79%の収率)。
- E. N- (カルボートブトキシメチル) -5-ヒドロキシアントラニル酸 [5]
- N- (カルボートブトキシメチル) -5-ベンジルオキシアントラニル酸、ベンジルエステル (45.0g、101mmol) を、2リットルの丸底フラスコ中の1:1THF/酢酸エチル (1200ml) 中に溶解した。雰囲気アルゴンでフラスコを1:1THF/酢酸エチル (4.0g) を添加した。反応雰囲気水を素ガスで置換し (4パーセント置換)、反応混合物を水素のバレン下に23時間攪拌した。雰囲気をアルゴンと置換し、セライトのパッドを通して反応混合物を濾過し、セライトパッドをメタノール (250ml) で洗浄した。溶媒を真空除去し、生ずる黄色固体を高真空下に回収置すると、N- (カルボートブトキシメチル) -5-ヒドロキシアントラニル酸が得られた (27.1g、100%の収率)。
- F. N- (カルボベンジルオキシメチル) -5-アミノプロピオン酸、エチルエステル [6]
- エチルアクリレート (24.4ml、225mmol) およびグリシン、ベンジルエステル、p-トルエンスルホン酸 (50.0g、148mmol) を250mlの丸底フラスコ中で一緒に攪拌しながら、注射器を介してトリエチルアミン (24.8ml、178mmol) を添加し、反応混合物を室温において22時間攪拌した。反応混合物を酢酸エチル (660ml) と10%水性Na₂CO₃ (300ml) との間に分配した。有機相を水 (100ml) および飽和NaCl (100ml) で洗浄した。有機相をMgSO₄上で乾燥し、濾過し、真空濃縮し、次いで高真空下に排気すると、N- (カルボベンジルオキシメチル) -5-アミノプロピオン酸、エチルエステルが黄色油状物として得られた (39.3g、73%の収率)。
- F. 1- (カルボートブトキシメチル) -4- (2-カルボエトキシエチル) -7-ヒドロキシ-3, 4-ジヒドロ-1H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2, 5-ジオン [7]
- N- (カルボートブトキシメチル) -5-ヒドロキシアントラニル酸 (26.7g、100mmol) を、乾燥した2リットルの丸底フラスコ中に入れた。反応雰囲気をアルゴンでフラスコし、無水DMF (500ml) 中のN- (カルボベンジルオキシメチル) -5-アミノプロピオン酸、エチルエステル (29.0g、109mmol) を添加し、次いで0- (7-アザベンゾジアゼピン-1-オール-1-イル) -1, 3, 3-トリメチルクロニウムヘキサフルオロホスフェート (HATU試薬、39.9g、105mmol) を添加した。トリエチルアミン (42.0ml、301mmol) を添加し、反応混合物を室温においてアルゴンのバレン下に16時間攪拌した。DMFを高真空下に回転蒸発器上で除去し、残留物を酢酸エチル (1.0リットル) と飽和NaHCO₃ (500ml) との間に分配した。有機相を水 (500ml) で洗浄し、MgSO₄で乾燥した。有機相を濾過し、揮発性物質を回転蒸発器上で真空除去し、残留油状物を高真空下に排気すると、油が得られた。この油を9:3酢酸エチル/メタノール (

1200ml) 中に取り、アルゴン雰囲気下に配置した。10%Pd/C (4.0g) を添加し、反応雰囲気水を水素ガスで置換した(4-パージ-充填)。反応混合物をアルゴンのバルーン下に45時間攪拌した。反応雰囲気水をアルゴンで置換し、懸濁液をセライトのパッドを通して濾過し、これを追加の300mlのメタノールで洗浄した。揮発性物質を真空除去し、残留物を最小量のジクロロメタン中に取り、シリカゲルのクロマトグラフィーにかけ、このカラムを1:1酢酸エチル/ヘキサンで溶離した。粗生成物を含有する画分(Rf=0.17、酢酸エチル/ヘキサン4)を一括にし、溶媒を真空除去すると、1- (カルボート-ブトキシメチル) -4- (2-カルボエトキシエチル) -7-ヒドロキシ-3, 4-ジヒドロ-1H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2, 5-ジオンが白色固体として得られた(20.2g, 50%の収率)。

G. 1- (カルボート-ブトキシメチル) -4- (2-カルボエトキシエチル) -7- [(4-シアノフェニル) メチル] -3, 4-ジヒドロ-1H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2, 5-ジオン [8]

1- (カルボート-ブトキシメチル) -4- (2-カルボエトキシエチル) -7-ヒドロキシ-3, 4-ジヒドロ-1H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2, 5-ジオン (19.5g, 48mmol)、 α -ブロモ-p-トルニトリル (11.3g, 58mmol)、および炭酸カリウム (9.0g, 65mmol) を丸底フラスコ中で一緒にした。無水DMF (300ml) を添加し、反応混合物を40℃において4日間攪拌した。反応混合物を濾過し、濾液を回転蒸発器上で真空濃縮した。残留物を酢酸エチル (500ml) と水 (100ml) との間に分配した。有機相を飽和NaCl (50ml) で洗浄し、 Na_2SO_4 上で乾燥した。揮発性物質を真空下に回転蒸発器上で除去し、残留物をシリカゲルのクロマトグラフィーにかけ、このカラムを5:6酢酸エチル/ヘキサンで溶離した。粗生成物を含有する画分(Rf=0.17、5:6酢酸エチル/ヘキサン4)を一括にし、溶媒を真空下に回転蒸発器上で除去すると、1- (カルボート-ブトキシメチル) -4- (2-カルボエトキシエチル) -7- [(4-シアノフェニル) メチル] -3, 4-ジヒドロ-1H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2, 5-ジオンが得られた(20.7g, 83%の収率)。

H. 1- (カルボート-ブトキシメチル) -4- (2-カルボエトキシエチル) -7- [(4-アミジノフェニル) メチル] -3, 4-ジヒドロ-1H-1, 4-ベンゾジア

アゼピン-2, 5-ジオン、アセテート [9]

ガス分散のための入口管および1:1の2NのNaOH/クロックス (Clorox) 漂白剤を含有するトラップに接続された出口管を装備した、乾燥した3首底フラスコの中に、1- (カルボート-ブトキシメチル) -4- (2-カルボエトキシエチル) -7- [(4-シアノフェニル) メチル] -3, 4-ジヒドロ-1H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2, 5-ジオン (16.0g, 31mmol) を入れた。フラスコをアルゴンガスでフラッシュし、無水ピリジン (90ml) を添加し、次いでトリエチルアミン (70ml) を添加した。生ずる溶液を硫化水素ガスで飽和させた。入口管および出口管を除去し、反応混合物を55℃~60℃において21時間加熱した。反応混合物をアルゴンでパージし、揮発性物質を回転蒸発器上で真空下に除去した。残留物を5:4ジクロロメタン/トルエン (450ml) 中に取り、これをまた回転蒸発器上で真空下に除去した。ジクロロメタン/トルエンを使用する処理をもう一度反復した。残留物をアセトン (300ml) 中に取り、注射器を介してヨードメタン (5.2ml, 84mmol) を添加した。反応混合物を攪拌し、60℃~65℃に5.5時間加熱した。反応混合物を冷却し、揮発性物質を回転蒸発器上で真空下に除去した。残留物をアルゴン雰囲気下に無水メタノール (200ml) 中に取り、酢酸アンモニウム (9.25g, 120mmol) を添加した。反応混合物を室温においてアルゴン雰囲気下に21時間攪拌した。揮発性物質を回転蒸発器上で真空下に除去し、残留物をアセトニトリル (200ml) 中に取り、凝結ガラスの漏斗を通して濾過した。反応器を追加のアセトニトリル (100ml) でリンスし、これをまた凝結ガラスの漏斗を通して濾過した。濾液を回転蒸発器上で真空濃縮し、を高真空下に排気すると、1- (カルボート-ブトキシメチル) -4- (2-カルボエトキシエチル) -7- [(4-アミジノフェニル) メチル] -3, 4-ジヒドロ-1H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2, 5-ジオン、アセテートが得られた (18.2g, 99%の収率)。

I. 1- (カルボキシメチル) -4- (2-カルボエトキシエチル) -7- [(4-アミジノフェニル) メチル] -3, 4-ジヒドロ-1H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2, 5-ジオン、塩酸塩 [10]

1- (カルボート-ブトキシメチル) -4- (2-カルボエトキシエチル) -7- [(4-アミジノフェニル) メチル] -3, 4-ジヒドロ-1H-1, 4-ベンゾジア

ゼピン-2, 5-ジオン、アセテート (17.7g, 30mmol) を乾燥丸底フラスコの中に入れ、注射器を介して4MのHCl/ジオキササンを添加した。反応混合物を室温において1.5時間攪拌し、次いで無水エチルエーテル (1.0リットル) の攪拌した溶液に滴下した。添加が完結した後、生ずる懸濁液をさらに15分間攪拌し、アルゴンガスのブランケット下に越過した。収集した固体を無水エチルエーテルで洗浄し、丸底フラスコに移し、高真空下に乾燥すると、1- (カルボキシメチル) -4- (2-カルボエトキシエチル) -7- [(4-アミジノフェニル) メチル] -3, 4-ジヒドロ-1H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2, 5-ジオン、塩酸塩が白色固体状物として得られた (14.2g, 93%の収率)。¹H NMR (CD₃OD) : 1.25ppm (t, 3H) ; 2.70ppm (m, 2H) ; 3.70-4.21ppm (m, 4H) ; 4.12 (q, 2H) ; 4.50ppm (s, 2H) ; 5.39ppm (s, 2H) ; 7.20ppm-7.40ppm (m, 3H) ; 7.71ppm (d, 2H) ; 7.83ppm (d, 2H)。

J. Fmoc-グリシル-グリシル-グリシル-S-トリチルシステイニル-リンクアミド樹脂 [11]

Fmoc-リンク (Rink) アミド樹脂 (12.5g, 0.66mmol/g, 8.25mmol) を順次にN-Fmoc-S-トリチルシステイン、Fmoc-グリシン、Fmoc-グリシン、Fmoc-グリシン、およびFmoc-グリシンも下記の固相ペプチド合成プロトコルに従いカップリングさせた：樹脂を20%ペプチジン/DMF (2回、5分、次いで15分) で処理することによって、N-末端のFmoc基を除去した。樹脂をDMF (4×1分) で洗浄した。生ずる樹脂-担持N-末端遊離アミンをDMFの中に懸濁させ、1:1の2- (1H-ベンゾトリアゾール-1-イル) -1, 1, 3, 3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート/N-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HATU/HOBt) およびジイソプロピルエチルアルミニウム (8.3ml, 47.6mmol) の0.45M溶液で前もって活性化したN-Fmoc-S-トリチルシステイン (13.7g, 23.4mmol) と反応させた。樹脂をDMF (3回)、ジクロロメタン (3回)、およびDMF (3回) で洗浄した。Fmoc-グリシン (7.0g, 23.5mmol) を同様に3つの順次の手順において樹脂担持ペプチドと反応させて、Fmoc-グリシル-グリシル-グリシル-S-トリチルシステイニル-リンクアミド樹脂を生成した。樹脂をジクロロメタン (3回) で洗浄し、真空乾燥した。樹脂の小さい部分についての置換分析は、樹脂置換が0.13mmol

/gであることを示した。

K. 1- [(カルボキシグリシル-グリシル-グリシル-S-トリチルシステインアミド) メチル] -4- (2-カルボエトキシエチル) -7- [(4-アミジノフェニル) メチル] -3, 4-ジヒドロ-1H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2, 5-ジオン、トリフルオロアセテート [12]

Fmoc-グリシル-グリシル-グリシル-S-トリチルシステイニル-リンクアミド樹脂 (53.4g, 6.94mmol) を20%ピペリジン/DMF (75ml, 5分、次いで15分) (2回) で処理し、DMF (2回) で洗浄した。別々に、1- (カルボキシメチル) -4- (2-カルボエトキシエチル) -7- [(4-アミジノフェニル) メチル] -3, 4-ジヒドロ-1H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2, 5-ジオン、塩酸塩 (5.9g, 11.36mmol) をアルゴン雰囲気下に乾燥丸底フラスコの中に入れ、無水DMF (75ml) 中に溶解した。この溶液を攪拌し、0°Cに冷却し、4-メチルモルホリン (1.01ml, 9.2mmol) で処理し、次いでイソブチルクロロホルメート (1.13ml, 8.7mmol) を滴下した。添加が完結した後、この溶液を0°Cにおいてさらに5分間攪拌し、前述したように発生させた樹脂-担持ペプチド遊離アミンに添加した。この樹脂をDMF (6回) およびジクロロメタン (3回) で洗浄した。樹脂を3回トリフルオロ酢酸 (40ml) で10分間処理し、各回脱保護混合物を丸底フラスコの中に排出した。樹脂を2回ジクロロメタン (75ml) で洗浄した。ジクロロメタン洗液をトリフルオロ酢酸脱保護混合物と一緒にし、揮発性物質を回転蒸発器上で真空下に除去した。樹脂を無水クロロホルムで数回処理し、各回クロロホルムを回転蒸発器上で真空下に除去した。システインスルフィドリルへのトリチル基の結合を示す、残基のオレンジ色/黄色が消失するまで、これを反復した。粗生成物を高真空下に排気すると、1- [(カルボキシグリシル-グリシル-グリシル-S-トリチルシステインアミド) メチル] -4- (2-カルボエトキシエチル) -7- [(4-アミジノフェニル) メチル] -3, 4-ジヒドロ-1H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2, 5-ジオン、トリフルオロアセテート (8.4g) が得られた。この生成物を逆相C18 HPLCにより精製した。このカラムに粗生成物のDMF溶液 (70mg/ml) を負荷し、90%アセトニトリル/水 (溶媒B) 中の0.1% TFAおよび水 (溶媒A) 中の0.1% TFAの線形勾配で溶離した。勾配は40分にわたって20%B/A~45%B/A~45で

ーカルボキシエチル) -7- [(4-アミノジノフェニル) メチル] -3, 4-ジヒドロ-1H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2, 5-ジオン、トリフルオロアセテートが白色粉末として得られた (1.08g, 12.4mmol, 58%の収率)。

実施例2

テクネチウム-99mで放射能標識化するブラシ-ボバイアル法

0.9%生理食塩水中に溶解した100 μ lの1mg/mlのTFA塩溶液としてほぼ100 μ gの実施例1のベンゾジアゼピン誘導体化合物を、「ブラシ-ボバイアル」に添加した。このブラシ-ボバイアルは、凍結乾燥した5mgのナトリウムグルコヘプタネート二水和物、50 μ gの塩化第一スズ二水和物、および100 μ gのナトリウムエデレート二水和物を含有した。次いで、全体積が1.1mlになるように、このバイアルを 99m Tc-ナトリウムペルテクネート (30~50mCi) および生理食塩水で再構成した。再構成後、バイアルを室温において30分間インキュベートした。

【0077】

99m Tc標識化ベンゾジアゼピン誘導体の純度を、下記の条件下に逆相析出HPLCにより測定した：ウォータース (Waters) デルタ・パックC18, 5 μ g, 3.9mm \times 150mm分析用カラムに、各放射能標識化ペプチドを負荷し、ペプチドを1.2ml/分に等しい溶媒流速で溶離した。12~25%溶媒B/溶媒Aの線形勾配 (溶媒Aは水中の0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸 (TFA) であり、そして溶媒Bは90/10 (v/v) アセトニトリル/水中の0.1% (v/v) TFAである) を20分かけて使用し、次いで25~100%溶媒B/溶媒Aの線形勾配を4分かけて使用し、そして100%溶媒B/溶媒Aを3分かけて使用して、勾配溶離を実行した (方法1)。

【0078】

コンピュータ化データ収集および解析システム (Waters Millenium) にリンクしたインライン放射分析検出器を使用するHPLC法において、放射性成分を検出した。 99m Tc-グルコヘプタネート、 99m Tc-エデレート、および 99m Tc-ナトリウムペルテクネートはこれらの条件下に1~4分に溶出するが、 99m Tc-標識化ベンゾジアゼピン誘導体は非常に長い時間後に溶出する。放射能化学的純度 (主 99m Tc生成物ピークの面積%により決定される) は \geq 90%であった。

【0079】

あった。画分を逆相C18 HPLCにより分析し、純粋な生成物を含有する画分を一括にし、凍結乾燥させると、1- [(カルボキシグリシル-グリシル-グリシル-5-トリチルシステインアミド) メチル] -4- (2-カルボエチキエチル) -7- [(4-アミノジノフェニル) メチル] -3, 4-ジヒドロ-1H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2, 5-ジオン、トリフルオロアセテートが白色粉末として得られた (2.41g, 2.17ml, 31%の収率)。エレクトロスプレー質量分析は、998の分子イオンピーク (M+H⁺) を示した (C₂₄H₃₄N₆O₈S) についての理論値は998.4である)。

1. 1- [(カルボキシグリシル-グリシル-グリシル-グリシル-システインアミド) メチル] -4- (2-カルボエチキエチル) -7- [(4-アミノジノフェニル) メチル] -3, 4-ジヒドロ-1H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2, 5-ジオン、トリフルオロアセテート [13]

1- [(カルボキシグリシル-グリシル-グリシル-5-トリチルシステインアミド) メチル] -4- (2-カルボエチキエチル) -7- [(4-アミノジノフェニル) メチル] -3, 4-ジヒドロ-1H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2, 5-ジオン、トリフルオロアセテート (2.38g, 2.14mmol) を丸底フラスコの中に入れ、メタノール (100ml) 中に溶解した。攪拌した溶液を1.0Mの水酸化リチウムの水溶液 (8.7ml, 8.7mmol) で室温において20時間処理した。トリフルオロ酢酸 (0.67ml, 8.7mmol) を添加して反応を急冷し、揮発性物質を回転蒸発器上で真空中に除去した。残留物をトリフルオロ酢酸/トリエチルシラン/水の91:4:5混合物 (100ml) で45分間処理した。揮発性物質を回転蒸発器上で真空中に除去した。残留物を90%アセトニトリル/水中の0.1%TFA (20ml) 中に溶解し、攪拌した溶液を水中の0.1%TFA (200ml) で希釈した。セラライトのパッドを通して生ずる沈澱を濾過し、これを追加の水中の0.1%TFA (100ml) で洗浄した。一緒にした濾液を調製用逆相C18 HPLCにより精製した (少しずつ)。このカラムを40分かけて100%A~15%B/Aの線形勾配で溶離した (水中の0.1%TFAは溶媒Aであり、そして90%アセトニトリル/水中の0.1%TFAである)。画分を逆相C18 HPLCにより分析し、純粋な生成物を含有する画分を---緒にし、凍結乾燥させると、1- [(カルボキシグリシル-グリシル-グリシル-システインアミド) メチル] -4- (2

また、^{99m}Tc標識化ベンゾジアゼピン誘導体の純度をTLC品質コントロール分析により測定した。放射能標識化ペプチドの試料を2つのゲルマニウム (Germanium) 中で現象し、乾燥させた。SASストリップをRf0.75において切断し、そしてMAMストリップをRf0.40において切断した。ストリップの部分を線量カリブレターにおいて放射能について計数し、そして各ストリップの上部および底部の部分の活性百分率を計算した。各試料の放射化学的純度を次のようにして計算した：

$$\text{TLCによる純度} = \text{底部 (SAS) \%} - \text{底部 (MAM) \%}$$

TLCによる放射化学的純度は $\geq 90\%$ であった。

実施例3

テクネチウム-99mで放射能標識化する処方キット法

成分を適当な比において水溶液中で一緒にし、pHをpH7.4に調節し、1.0mlをガラスバイアルの中に分散させ、凍結乾燥することによって、処方キットを調製した。1ml (1つのバイアル) が下記の成分を含有するように、成分を水溶液中に溶解した：50 μ gの実施例1のベンゾジアゼピン誘導体および25mgのナトリウムグルコヘプトネート二水和物、50 μ gの塩化第一スズ二水和物、および5mgの1-メチオニン。全体量が1.0mlであるように、処方キットを^{99m}Tc-ナトリウムペルテクネート (45~55mCi) および生理食塩水で再構成した。再構成後、処方キットを沸騰する水浴中で100℃において10分間インキュベートし、室温において20分間放冷した。

【0080】

^{99m}Tc標識化ベンゾジアゼピン誘導体の純度を、下記の条件下に逆相分析用HPLCにより測定した：ゾルバックス (Zorbax) 300SB C18、4 μ g、4.6mm \times 250mm分析用カラムに、各放射能標識化ペプチドを負荷し、ペプチドを1.2ml/分に等しい溶媒流速で溶離した。23~46%溶媒B/溶媒Cの線形勾配 (溶媒Cは水中の5mMのテトラブチルアンモニウムホスフェートpH7.5であり、そして溶媒Bは60/40アセトニトリル/水中の5mMのテトラブチルアンモニウムホスフェートpH7.5

である) を20分かけて使用し、次いで46~100%溶媒D/溶媒Cの線形勾配を5分かけて使用し、そして100%溶媒D/溶媒Cを3分かけて使用して、勾配溶離を実行した (方法2)。

【0081】

実施例2において方法1について記載した同一検出法により、HPLC方法2において放射性成分を検出した。処方キット調製物から得られた放射化学的純度 (主として^{99m}Tc生成物ピークの面積%により決定される) は、 >6 時間について $\geq 90\%$ であった。

【0082】

また、実施例2に記載するようなTLC品質コントロール分析により、^{99m}Tc標識化ベンゾジアゼピン誘導体の純度を測定した。

【0083】

実施例1において合成された^{99m}Tc標識化ベンゾジアゼピン誘導体のHPLCおよびTLC分析の結果を表1に示す。

【0084】

【表1】

表1
99mTc標識化ベンゾジアゼピン誘導体のHPLCおよびTLC分析結果

	TLC純度 (%)	HPLC法	HPLC保持時間 (分)	HPLC純度 (%)
実施例2	99	1	10.8, 12.0	92
実施例3*	99	2	11.8, 13.7	94
	100	2	11.6, 13.5	94

・ 2つのエントリリーは処方キットの2つの異なるロットを表す。

【0085】

実施例4

in vitro研究

99mTc-ベンゾジアゼピン誘導体を実施例2に記載されているように製造した。

【0086】

血小板に密んだ血漿 (PRP) の調製。すべての実験において、実験の日にクエン酸添加ヒト血液からの血小板を単離した。医師による十分な説明と患者による自主的な同意、または選抜を得た後、健康な成人ボランティアの肘前静脈から27 mlの血液を抽出して、3mlのクエン酸ナトリウム (3.8%w/v, pH7.4) を含有するポリプロピレン注射器の中に入れた。生物学的流体を取り扱う普遍的予防手段に従った。クエン酸添加血液を50mlの円錐形遠心管に移し、900rpm (160×g) において10分間遠心してPRPを得た。

【0087】

洗浄した血小板。PRPを2,200rpm (1,400×g) において12分間遠心することに

よって、洗浄した血小板を調製した。血小板含量が低い血漿 (PPP) をデカントし、生ずるペレットを変性タイロード緩衝液の中に懸濁させた。PPPをデカントし、廃棄した。変性タイロード緩衝液 (0.8ml/mlのもの)PRP) を血小板ペレットの上に直ちに層状化し、プロスタグランジンE₁ (PGE₁: 1μlの40μMの溶液/mlのタイロード緩衝液) を添加して血小板の活性化を防止した。(McLane MA, Kowalska MA, Silver L, Sharritl SJおよびNiewiarowski S. (1994) Biochem J. 201: 429-426)。ペレットをプラスチック製パスツールピペットで再懸濁させた。遠心工程を反復して血小板を洗浄し、結合アッセイのために血小板を150mlのタイロード緩衝液の中に希釈した。

【0088】

ポリエチレンイミン処理フィルター。アッセイ前に少なくとも1時間フィルター (GF/C) を10mMのTris-HCl (pH9.1) ポリエチレンイミン (0.5%) およびP829 (0.001%) 中の予備ソーキングして、フィルターに対する 99mTc標識化ベンゾジアゼピン誘導体の非特異的結合を減少させた。

【0089】

洗浄した血小板に対する 99mTc-ベンゾジアゼピン誘導体の結合。 99mTc-ベンゾジアゼピン誘導体 (50、30、10、7、5、3、1、0.7、0.5、0.3、0.1、および0.07mMの最終濃度) を含有するタイロード緩衝液の全体積250μlにおいて緩流水中で37℃において60分間シラン化ガラス管の中で、血小板をインキュベートした。「活性化」血小板に対する 99mTc-ベンゾジアゼピン誘導体の結合を測定するために、ADP (20μMの最終濃度) の0.5mMの溶液の10μlのアリコート、および250mMのCaCl₂ およびMgCl₂ の1:1混合物の10μlのアリコートを適当な管に添加した。過剰の非標識化ベンゾジアゼピン誘導体 (100μM) を完全に飽和したGF11b/11aレセプターに添加することによって、非特異的結合を測定した。真空源 (15~20mmHg) に接続されたブランドル・セル (Brandel Cell) 収集器 (カタログNo. SM24T, Brandel、マリイランド州ガイサースバーグ) を使用して、処理したGF/Cガラスファイバーのフィルター (カタログNo. PF24-GF/C, Brandel、マリイランド州ガイサースバーグ) を通して通過することによって、血小板に結合した 99mTc-ベンゾジアゼピン誘導体を遊離 99mTc-

ベンゾジアゼピン誘導体から分離した。次いでフィルターを9mlの10mMのTris-HCl緩衝液pH7.8 (4℃) で洗浄し、ガンマカウンタ中で放射能について計数した。

【0090】

計算。過剰の非標識化ベンゾジアゼピン誘導体の存在下の非特異的結合を過剰のベンゾジアゼピン誘導体の非存在下に測定した全結合から減ずることで、³H-Tc-ベンゾジアゼピン誘導体の特異的結合を計算した。下記の文献に記載されているように、データをスキッチャードプロットとしてプロットした：Bylung BDおよびYamamura HI, Methods for receptor binding, Ravens Press Ltd. (ニューヨーク州, 1990) pp. 1-32。データ点をカレイダグラフ (Kaleidagraph) (Synergy Software Inc.) ソフトウェアパッケージにおいて線形回帰関数と適合させた。K_d 値を勾配の負逆数として計算した。統計。インスター・プログラム (Instar Program) (GraphPad Software, カリフォルニア州サンディエゴ) からの対合スチューデントのt検定を使用し、2因子の各々における2因子のベルの間で、各応答変数を比較した。帰無仮説の棄却のために、限界p値を0.05に設定した。応答変数について：K_d；レベル1：基底 (ADPなし)；レベル2。活性化 (ADP)、因子レベルを同一個体から単離した血小板において比較した。実験を同時に実施した。被検体からの血小板を使用した。休止および活性化ヒト血小板に対する³H-Tc-ベンゾジアゼピン誘導体の結合についての平均K_dは、それぞれ、30.5nMおよび13.5nMであった。こうして、より多くの³H-Tc-ベンゾジアゼピン誘導体は活性化血小板に結合した。試験したすべての濃度にわたる活性化血小板に対する結合の平均増加倍率は1.8であり、1.2~2.3倍の範囲であった。K_dが誘導されたスキッチャードプロットから得られたデータを表2に要約する。

【0091】

【表2】

表2
ヒト血小板に対する結合についてのK_d値 (nM)

	テクネチウム Tc 99m P424	
	基底	ADP
被検体1	32	15
被検体2	20	12
被検体3	47	20
被検体4	23	7
平均	30.5±6	13.5±3

【0092】

これらのデータが証明するように、本発明に従い製造した³H-Tc-ベンゾジアゼピン誘導体は静止血小板よりも活性化された血小板により高い効力で結合する。

実施例5

イヌモデルにおける³H-Tc標識化ベンゾジアゼピン誘導体
を使用する深静脈の血栓症のin vivo造影

3匹の雄豚のイヌ (25~35ポンド、一夜断食させた) をケタミンとアセプロザミンとの組合わせで筋肉内鎮静させ、次いでナトリウムペンタトバルビタールで静脈内麻酔した。各動物において、18ゲージの血管カテーテルを右大腿静脈の遠位半分に挿入し、8mmのDacron[®]の巻いたステントレス鋼塞栓症コイル (Cook Co., インディアナ州ブルーミントン) を大腿静脈のほぼ中間大腿骨に配置した。カテーテルを除去し、縫合した創傷およびコイルの配置をX線で証明された。次いで動物を一夜回復させた。

【0093】

コイルの配線後1日に、各動物を再麻酔し、静脈内生理食塩水点滴を各前足に配置し、膀胱カテーテルを挿入して尿を収集した。低エネルギーの、万能コリメーターを装備し、^{111m}Tcに対する感光ピークを有するガンマカメラ下に動物を仰臥させて配線した。

【0094】

実施例1のベンゾジアゼピン誘導体を^{111m}Tc [185~370mBq (5~10mCi)] で標識化し、1つの前足静脈内ラインの中にその挿入点において順次に注射した。ガンマカメラの造形を注射と同時に開始した。心臓上の前部画像を動力学的研究として最初の15分にわたって獲得し(10秒の画像の獲得)、次いで注射後は20分(どちらかがより短くても)の間ほぼ10~20分に、そして注射後1、2、3および4時間に獲得した。膀胱の上に鉛シールドを配置して、足の画像を収集した。

【0095】

最終画像後、各動物をペントバルビタールで深く麻酔した。ヘパリン化注射器を使用して、2つの血液試料を収集し、次いで心臓内またはポラス静脈内注射により安楽死投与量の飽和塩化カリウム溶液を投与した。次いで血拴を含有する大腸静脈、対側(対照)足の静脈の同様な切片、血拴に対して近位の静脈の切片、および大腿筋肉の試料を注意して解剖した。血拴、コイルおよびコリメーターDacron繊維を血管から解剖除去した。血拴、生理食塩水洗浄血管の試料、コイルおよびコリメーターDacron繊維を分離し、そして各試料を前もって秤量した試験管の中に入れた。試料を秤量し、Tc-99mチャンネルにおいてガンマウェルカウンタ一中で、注射した投与量の既知画分と一緒に計数した。

【0096】

安楽死直前に得られた血拴および血液における新鮮な血拴重量、注射投与量の百分率(10%) / g、および血拴/血液および血拴/筋肉の比を決定した。コンピュータに記憶させた画像から、血拴および隣接する筋肉の上に描いた問題の領域において測定した計数/線素の解析により、血拴/バックグラウンド比を決定した。これらの実験からの組織のデータを表3に示す。

【0097】
【表3】

表3
肺塞栓および深静脈血拴のイヌモデル¹

	足血拴	肺血拴
血拴/バックグラウンド ²	4.2 (n=2)	1.3 (n=1)
10%/g血拴	0.050±0.020	0.15±0.048
血拴/血液 ³	9.1±4.6	27±9
血拴/筋肉 ³	30±15	—
血拴/正常の肺 ³	—	29±9
血拴重量	430±210mg	30±15mg

¹ 平均±標準偏差

² 問題の画像の解析から

³ 注射された投与量%/g (10%/g) の比

【0098】

これらの結果が証明するように、本発明のTc-99m標識化ベンゾジアゼピンジオン誘導体を使用し、肺塞栓および深静脈血拴を急速にかつ効率よくin vivoにおいて検し出すことができる。

【0099】

以上の開示は本発明のある種の特定の態様を強調し、そしてすべての変更または同等の態様は添付された特許請求の範囲に記載される本発明の精神および範囲内に入ることを理解すべきである。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Title: International Search Report	
PCT/US 00/10093	
Information on patent family members	
Parent document and PCT search report	Publication date
NO 9108174 A	29-04-1993
<p>US 5250679 A 05-10-1993</p> <p>AT 133412 T 15-02-1996</p> <p>AU 673501 B 14-11-1996</p> <p>CA 2197692 A 21-05-1993</p> <p>DE 69207916 D 07-03-1996</p> <p>EP 0610334 T 03-06-1996</p> <p>ES 2085651 T 17-08-1994</p> <p>FI 941222 A 01-06-1996</p> <p>GR 3019517 T 31-07-1996</p> <p>JP 7500341 T 12-01-1995</p> <p>MD 941378 A 20-06-1994</p> <p>NO 5403836 A 04-04-1995</p> <p>US 5674865 A 07-10-1997</p> <p>US 5674863 A 07-10-1997</p> <p>US 5663166 A 02-09-1997</p> <p>US 5565449 A 15-10-1996</p>	
<p>US 5878657 A 09-03-1999</p> <p>AT 194293 T 15-07-2000</p> <p>AU 689643 B 02-04-1998</p> <p>AU 3452595 A 21-03-1996</p> <p>AU 6324894 A 24-10-1994</p> <p>BB 100036 A 29-11-1996</p> <p>BR 9406055 A 10-09-1996</p> <p>BR 9406820 A 10-09-1996</p> <p>CA 2159445 A 13-10-1994</p> <p>CN 1122577 A 15-05-1996</p> <p>EP 0692982 A 24-01-1996</p> <p>EP 0995761 A 26-04-2000</p> <p>FI 954055 A 02-11-1995</p> <p>FR 72889 A 28-06-1996</p> <p>JP 3042867 B 22-05-2000</p> <p>JP 8509710 T 15-10-1996</p> <p>LV 11106 A 20-04-1996</p> <p>LV 11106 B 20-04-1997</p> <p>NO 953886 A 30-11-1995</p> <p>NZ 263970 A 25-09-1996</p> <p>PL 311037 A 22-01-1996</p> <p>US 6010679 A 04-01-2000</p> <p>US 9422494 A 13-10-1994</p> <p>US 5744120 A 28-04-1998</p> <p>US 5750088 A 12-05-1998</p> <p>US 6015904 A 18-01-2000</p> <p>US 6022523 A 08-02-2000</p> <p>RO 114895 A 30-08-1999</p> <p>ZA 9402262 A 02-10-1995</p>	
<p>US 5830856 A 03-11-1998</p> <p>AU 709306 B 26-08-1999</p> <p>AU 2764295 A 04-01-1996</p> <p>CA 2191949 A 14-12-1995</p> <p>EP 0772660 A 14-05-1997</p> <p>JP 10501236 T 03-02-1998</p> <p>WO 9513496 A 14-12-1995</p> <p>US 6022520 A 08-02-2000</p> <p>ZA 9504549 A 26-02-1996</p> <p>AU 687080 B 19-02-1998</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Title: International Search Report	
PCT/US 00/10093	
Information on patent family members	
Parent document and PCT search report	Publication date
NO 9108174 A	29-04-1993
<p>US 5250679 A 05-10-1993</p> <p>AT 133412 T 15-02-1996</p> <p>AU 673501 B 14-11-1996</p> <p>CA 2197692 A 21-05-1993</p> <p>DE 69207916 D 07-03-1996</p> <p>EP 0610334 T 03-06-1996</p> <p>ES 2085651 T 17-08-1994</p> <p>FI 941222 A 01-06-1996</p> <p>GR 3019517 T 31-07-1996</p> <p>JP 7500341 T 12-01-1995</p> <p>MD 941378 A 20-06-1994</p> <p>NO 5403836 A 04-04-1995</p> <p>US 5674865 A 07-10-1997</p> <p>US 5674863 A 07-10-1997</p> <p>US 5663166 A 02-09-1997</p> <p>US 5565449 A 15-10-1996</p>	
<p>US 5878657 A 09-03-1999</p> <p>AT 194293 T 15-07-2000</p> <p>AU 689643 B 02-04-1998</p> <p>AU 3452595 A 21-03-1996</p> <p>AU 6324894 A 24-10-1994</p> <p>BB 100036 A 29-11-1996</p> <p>BR 9406055 A 10-09-1996</p> <p>BR 9406820 A 10-09-1996</p> <p>CA 2159445 A 13-10-1994</p> <p>CN 1122577 A 15-05-1996</p> <p>EP 0692982 A 24-01-1996</p> <p>EP 0995761 A 26-04-2000</p> <p>FI 954055 A 02-11-1995</p> <p>FR 72889 A 28-06-1996</p> <p>JP 3042867 B 22-05-2000</p> <p>JP 8509710 T 15-10-1996</p> <p>LV 11106 A 20-04-1996</p> <p>LV 11106 B 20-04-1997</p> <p>NO 953886 A 30-11-1995</p> <p>NZ 263970 A 25-09-1996</p> <p>PL 311037 A 22-01-1996</p> <p>US 6010679 A 04-01-2000</p> <p>US 9422494 A 13-10-1994</p> <p>US 5744120 A 28-04-1998</p> <p>US 5750088 A 12-05-1998</p> <p>US 6015904 A 18-01-2000</p> <p>US 6022523 A 08-02-2000</p> <p>RO 114895 A 30-08-1999</p> <p>ZA 9402262 A 02-10-1995</p>	
<p>US 5830856 A 03-11-1998</p> <p>AU 709306 B 26-08-1999</p> <p>AU 2764295 A 04-01-1996</p> <p>CA 2191949 A 14-12-1995</p> <p>EP 0772660 A 14-05-1997</p> <p>JP 10501236 T 03-02-1998</p> <p>WO 9513496 A 14-12-1995</p> <p>US 6022520 A 08-02-2000</p> <p>ZA 9504549 A 26-02-1996</p> <p>AU 687080 B 19-02-1998</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
information on patent family members

Patent document cited in search report				Int. and application no.	
US 5830856 A				PCT/US 00/10093	
Publication date	Patent family member(s)	Publication date	Publication date		
08-11-1994	AU 7241394 A	08-11-1994	08-11-1994		
27-10-1994	CA 2160120 A	27-10-1994	27-10-1994		
21-01-1995	EP 0693941 A	21-01-1995	21-01-1995		
27-08-1999	JP 2954385 B	27-08-1999	27-08-1999		
14-09-1996	JP 8508999 T	14-09-1996	14-09-1996		
27-10-1998	SG 49788 A	27-10-1998	27-10-1998		
27-10-1994	WO 9423758 A	27-10-1994	27-10-1994		
08-07-1997	US 5645815 A	08-07-1997	08-07-1997		
02-05-2000	US 6056940 A	02-05-2000	02-05-2000		
07-12-1999	US 5997845 A	07-12-1999	07-12-1999		
08-01-1996	US 5997845 A	08-01-1996	08-01-1996		
27-01-2000	ZA 9402439 A	27-01-2000	27-01-2000		
27-04-1995	AT 188387 T	27-04-1995	27-04-1995		
07-09-1992	AU 656617 B	07-09-1992	07-09-1992		
08-08-1992	AU 1411792 A	08-08-1992	08-08-1992		
10-02-2000	CA 2101942 A	10-02-2000	10-02-2000		
21-06-2000	DE 69230525 D	21-06-2000	21-06-2000		
24-11-1993	EP 0570493 A	24-11-1993	24-11-1993		
16-03-2000	ES 2141102 T	16-03-2000	16-03-2000		
09-07-1993	JP 2774378 B	09-07-1993	09-07-1993		
14-04-1994	JP 6503352 T	14-04-1994	14-04-1994		
03-09-1996	US 5552525 A	03-09-1996	03-09-1996		
21-10-1995	US 5561220 A	21-10-1995	21-10-1995		
01-12-1995	WO 9213572 A	01-12-1995	01-12-1995		
05-06-1997	US 5997844 A	05-06-1997	05-06-1997		
15-12-1998	US 5654272 A	15-12-1998	15-12-1998		
15-12-1998	US 5842600 A	15-12-1998	15-12-1998		
13-02-1998	US 5942501 A	13-02-1998	13-02-1998		
04-06-1998	US 5714379 A	04-06-1998	04-06-1998		
28-10-1997	US 5851541 A	28-10-1997	28-10-1997		
09-03-1999	US 5868474 A	09-03-1999	09-03-1999		
22-09-1998	US 5868474 A	22-09-1998	22-09-1998		
07-04-1998	US 5714372 A	07-04-1998	07-04-1998		
01-02-2000	US 6019958 A	01-02-2000	01-02-2000		
13-06-2000	US 6074627 A	13-06-2000	13-06-2000		
02-05-2000	US 6056940 A	02-05-2000	02-05-2000		
07-12-1999	US 5997845 A	07-12-1999	07-12-1999		
19-02-1998	AU 682080 B	19-02-1998	19-02-1998		
08-11-1994	AU 7241394 A	08-11-1994	08-11-1994		
27-10-1994	CA 2160120 A	27-10-1994	27-10-1994		
31-01-1996	EP 0693941 A	31-01-1996	31-01-1996		
27-08-1999	JP 2954385 B	27-08-1999	27-08-1999		
24-09-1996	JP 8508999 T	24-09-1996	24-09-1996		
15-06-1998	SG 49788 A	15-06-1998	15-06-1998		
27-10-1994	WO 9423758 A	27-10-1994	27-10-1994		
08-02-2000	US 6022520 A	08-02-2000	08-02-2000		
03-11-1998	US 5830856 A	03-11-1998	03-11-1998		
08-01-1996	ZA 9402439 A	08-01-1996	08-01-1996		
15-01-2000	AT 188387 T	15-01-2000	15-01-2000		
27-04-1995	AU 656617 B	27-04-1995	27-04-1995		
07-09-1992	AU 1411792 A	07-09-1992	07-09-1992		
09-06-1992	CA 2101942 A	09-06-1992	09-06-1992		
10-02-2000	DE 69230525 D	10-02-2000	10-02-2000		
21-06-2000	EP 0570493 A	21-06-2000	21-06-2000		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
information on patent family members

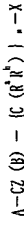
Patent document cited in search report				Int. and application no.	
US 5645815 A				PCT/US 00/10093	
Publication date	Patent family member(s)	Publication date	Publication date		
08-11-1994	ES 2141102 T	08-11-1994	08-11-1994		
27-10-1994	JP 2774378 B	27-10-1994	27-10-1994		
21-01-1995	JP 6503352 T	21-01-1995	21-01-1995		
27-08-1999	US 5552525 A	27-08-1999	27-08-1999		
14-09-1996	US 5561220 A	14-09-1996	14-09-1996		
27-10-1998	WO 9213572 A	27-10-1998	27-10-1998		
27-10-1994	US 5997844 A	27-10-1994	27-10-1994		
08-07-1997	US 5654272 A	08-07-1997	08-07-1997		
02-05-2000	US 5842600 A	02-05-2000	02-05-2000		
07-12-1999	US 5714379 A	07-12-1999	07-12-1999		
08-01-1996	US 5714372 A	08-01-1996	08-01-1996		
27-01-2000	US 5714372 A	27-01-2000	27-01-2000		
27-04-1995	US 5714372 A	27-04-1995	27-04-1995		
07-09-1992	US 5714372 A	07-09-1992	07-09-1992		
08-08-1992	US 5714372 A	08-08-1992	08-08-1992		
10-02-2000	US 5714372 A	10-02-2000	10-02-2000		
21-06-2000	US 5714372 A	21-06-2000	21-06-2000		
24-11-1993	US 5714372 A	24-11-1993	24-11-1993		
16-03-2000	US 5714372 A	16-03-2000	16-03-2000		
09-07-1993	US 5714372 A	09-07-1993	09-07-1993		
14-04-1994	US 5714372 A	14-04-1994	14-04-1994		
03-09-1996	US 5714372 A	03-09-1996	03-09-1996		
21-10-1995	US 5714372 A	21-10-1995	21-10-1995		
01-12-1995	US 5714372 A	01-12-1995	01-12-1995		
05-06-1997	US 5714372 A	05-06-1997	05-06-1997		
15-12-1998	US 5714372 A	15-12-1998	15-12-1998		
15-12-1998	US 5714372 A	15-12-1998	15-12-1998		
13-02-1998	US 5714372 A	13-02-1998	13-02-1998		
04-06-1998	US 5714372 A	04-06-1998	04-06-1998		
28-10-1997	US 5714372 A	28-10-1997	28-10-1997		
09-03-1999	US 5714372 A	09-03-1999	09-03-1999		
22-09-1998	US 5714372 A	22-09-1998	22-09-1998		
07-04-1998	US 5714372 A	07-04-1998	07-04-1998		
01-02-2000	US 5714372 A	01-02-2000	01-02-2000		
13-06-2000	US 5714372 A	13-06-2000	13-06-2000		

【補正方法】変更

【補正の内容】

(0063)

より好ましくは、本発明の化合物は下記式の単一のチオールを含む有する基を含んで成る金属イオンキレート化合物を含んで成る：



式中AはH、HOC-、H₂NOC-、-NHOC-、-OOC-、R₂NOC-またはRⁿであり、BはH、SH、-NHⁿ、-N(R¹)-またはRⁿであり、ZはHまたはRⁿであり、XはSH、-NHⁿ、-N(R¹)-またはRⁿであり、R¹、R²、RⁿおよびRⁿは独立してH、直鎖状C-シアルキル、分枝鎖状C-シアルキル、または環状C-シアルキルであり、nは0、1または2であり、RⁿはC-シアルキル、アミノ酸、または2〜約10アミノ酸を含んで成るペプチドであり、そして(1) Bが-NHⁿまたは-N(R¹)-である場合、XはSHでありかつnは1または2であり、(2) Xが-NHⁿまたは-N(R¹)-である場合、BはSHでありかつnは1または2であり、(3) BがRⁿまたはRⁿである場合、AはHOC-、H₂NOC-、-NHOC-または-OOC-であり、XはSHでありかつnは0または1であり、(4) AがHまたはRⁿである場合、BがSHであるとき、Xは-NHⁿまたは-N(R¹)-でありかつXがSHであるとき、Bは-NHⁿまたは-N(R¹)-でありかつnは1または2であり、(5) XがHまたはRⁿである場合、AはHOC-、H₂NOC-、-NHOC-または-OOC-でありかつBはSHであり、(6) Zがメチルである場合、Xはメチルであり、AはHOC-、H₂NOC-、-NHOC-または-OOC-でありかつBはSHでありかつnは0であり、そして(7) BがSHである場合、XはSHではなくそしてXがSHであるとき、BはSHではない。

(訂正の理由1)

外国語明細書第36頁第22行及び第37頁第3行目(請求項9)の「R¹」を「R¹」と誤記したため、「R¹」に訂正する。

(訂正の理由2)

外国語明細書第13頁第26行目及び第28行目の「R¹」を「R¹」と誤記したため、「R¹」に訂正する。